

ANNÉE 1926

THÈSE

N° _____

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PRÉSENTÉE PAR

RENÉ PATAY

Diplômé de l'Institut d'Hygiène

Né à Rennes, le 5 Janvier 1898

Travail de l'Institut Pasteur (Laboratoire de Microbie générale)

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DE LA TOXICITÉ

DU

Bacille Dysentérique Shiga

ET DE SES APPLICATIONS

(Immunisation — Flocculation)

Président : M. BEZANÇON, Professeur

PARIS

AMÉDÉE LEGRAND, ÉDITEUR

93, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 93

1926

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie.	NICOLAS.
Anatomie médico-chirurgicale.	CUNÉO.
Physiologie.	ROGER.
Physique médicale.	STROHL.
Chimie organique et chimie générale.	DESGREZ.
Bactériologie.	N...
Parasitologie et histoire naturelle médicale.	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.	Marcel LABBÉ.
Pathologie médicale.	SICARD.
Pathologie chirurgicale.	LECENE.
Anatomie pathologique.	ROUSSY.
Histologie.	PRENANT.
Pharmacologie et matière médicale.	N...
Thérapeutique.	CARNOT.
Hygiène.	Léon BERNARD.
Médecine légale.	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.	MÉNÉTRIER.
Pathologie expérimentale et comparée.	N...
Clinique médicale.	GILBERT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	WIDAL.
Hygiène et clinique de la première enfance.	MARFAN.
Clinique des maladies des enfants.	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale.	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	JEANSELME.
Clinique des maladies du système nerveux.	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses.	TEISSIER.
	DELBET.
Clinique chirurgicale.	HARTMANN.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.	TERRIEN.
Clinique urologique.	LEGUEU.
Clinique d'accouchements.	COUVELAIRE.
	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale.	DUVAL.
Clinique propédeutique.	SERGENT.
Professeur sans chaire.	ROUVIÈRE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.		MM.	
ABRAMI	Pathologie médicale	HOVELACQUE	Anatomie.
ALGLAVE	Pathologie chirurgi- cale.	JOYEUX	Parasitologie.
AUBERTIN	Pathologie médicale.	LABBÉ (Henri)	Chimie biologique.
BASSET	Pathologie chirurgi- cale.	LARDENNOIS	Pathologie chirurgi- cale.
BAUDOUIN	Pathologie médicale.	LE LORIER	Obstétrique.
BINET	Physiologie.	LEMAITRE	Oto-rhino-laryngolo- gie.
BLANCHETIÈRE	Chimie biologique.	LEMIERRE	Pathologie médicale.
BRANCA	Histologie.	LÉVY-SOLAL	Obstétrique.
BRULÉ	Pathologie médicale.	LHERMITTE	Pathologie mentale.
BUSQUET	Pharmacologie et ma- tière médicale.	LIAN	Pathologie médicale.
CADENAT	Pathologie chirurgi- cale.	MATHIEU	Pathologie chirurgi- cale.
CHAMPY	Histologie.	METZGER	Obstétrique.
CHIRAY	Pathologie médicale.	MOCQUOT	Pathologie chirurgi- cale
CLERC	Pathologie médicale.	MONDOR	Pathologie chirurgi- cale.
DEBRÉ	Hygiène.	MOURE	Pathologie chirurgi- cale.
I. de JONG	Anatomie pathologi- que.	MULON	Histologie.
DUVOIR	Médecine légale.	PHILIBERT	Bactériologie.
ÉCALLE	Obstétrique.	RIBIERRE	Pathologie médicale.
FIESSINGER	Pathologie médicale	RICHET Fils	Physiologie.
FOIX	Pathologie médicale.	TANON	Pathologie médicale.
GARNIER	Pathologie expéri- mentale.	VAUDESCAL	Obstétrique.
HARVIER	Pathologie médicale.	VERNE	Histologie.
HEITZ-BOYER	Urologie.	VILLARET	Pathologie médicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.		MM.	
GOUGEROT	Pathologie médicale.	RETTERER	Histologie.
GUÉNIOT	Obstétrique.		

IV. — AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE

à titre permanent

MM.		MM	
AUVRAY	Clinique chirurgicale.	LÉRI.	Clinique médicale.
CHEVASSU. . . .	Clinique chirurgicale.	LÉPER.	Clinique médicale.
LAISNEL-LAVASTINE. .	Clinique médicale.	PROUST	Clinique chirurgicale.
LEREBoullet. .	Clinique médicale in- fantile.	RATHERY	Clinique médicale.
		SCHWARTZ . . .	Clinique chirurgicale.

V. — CHARGES DE COURS

MM. MAUCLAIRE, agrégé. . . .	}	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes adul- tes.
FREY		Stomatologie.
CHAILLEY-BERT		Éducation physique.
LEDoux-LEBARD		Radiologie clinique.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE

DE MON FRÈRE

CAMILLE PATAY, LICENCIÉ EN DROIT
MARÉCHAL DES LOGIS D'ARTILLERIE DE TRANCHÉES
MÉDAILLÉ MILITAIRE, CROIX DE GUERRE
MORT DES SUITES DE SES BLESSURES

DE MON GRAND-PÈRE

LE DOCTEUR CAMILLE PATAY
MÉDECIN DE L'HÔTEL-DIEU D'ORLÉANS
PRÉSIDENT DU SYNDICAT DES MÉDECINS DU LOIRET

DE MES ARRIÈRE-GRAND-PÈRE ET AIEUX

MÉDECINS

A MON PÈRE

LE DOCTEUR RENÉ PATAY

PRÉSIDENT DE LA FÉDÉRATION
DES SYNDICATS MÉDICAUX D'ILLE-ET-VILLAIN ET
DE L'ASSOCIATION DÉPARTEMENTALE

A MA MÈRE

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR F. BEZANÇON

PROFESSEUR DE CLINIQUE MÉDICALE A LA FACULTÉ

MÉDECIN DE L'HOPITAL ST-ANTOINE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

A M. LE DOCTEUR E. ROUX
DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

*Qui nous manifesta maintes fois sa
bienveillance au cours de nos tra-
vaux, en très respectueux hom-
mages de dévouement et de recon-
naissance.*

A MON MAITRE

LE DOCTEUR J. DUMAS

*En témoignage de gratitude et de
respectueux attachement.*

A MES MAÎTRES
A L'ÉCOLE DE MÉDECINE DE RENNES

M. LE PROFESSEUR BODIN
M. LE PROFESSEUR BOURDINIÈRE
M. LE PROFESSEUR CASTEX
M. LE PROFESSEUR CHENET
M. LE PROFESSEUR CHEVREL
M. LE PROFESSEUR DAYOT
M. LE PROFESSEUR HARDOUIN
M. LE PROFESSEUR LAUTIER
M. LE PROFESSEUR LE DAMANY
M. LE PROFESSEUR LE MONIET
M. LE PROFESSEUR MARQUIS
M. LE DOCTEUR PERRIER
M. LE PROFESSEUR SAVOURÉ
M. LE PROFESSEUR VÉRON (*in memoriam*)

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

M. LE PROFESSEUR BRUMPT
M. LE PROFESSEUR M. LABBÉ
M. LE DOCTEUR LANGERON

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT D'HYGIÈNE

Introduction

Les travaux relatifs aux propriétés toxiques et antigènes du bacille dysentérique décrit par Shiga, en 1898, sont fort nombreux. Les congrès « Pour l'établissement du sérum antidysentérique » du Comité d'Hygiène de la Société des Nations viennent encore de donner une nouvelle impulsion aux recherches et pourtant le dernier de ces congrès n'a pu aboutir à des résultats pratiques définitifs, trop de points ayant encore besoin d'être élucidés. D'autre part, les récents travaux de Ramon ont donné un nouvel intérêt à l'étude des toxines.

Pour ces diverses raisons nous avons choisi l'étude de la toxine dysentérique comme base de ce travail. Nous examinerons donc, la toxicité du bacille de Shiga étant démontrée, par quels moyens nous pouvons obtenir les effets toxiques les plus forts et les plus réguliers.

Ceci fait nous étudierons les applications pratiques basées sur le fait qu'il existe un parallélisme certain entre le pouvoir toxique et le pouvoir antigène, à savoir : la vaccination humaine et l'immunisation des animaux producteurs de sérum antidys-

sentérique. Nous terminerons par l'étude de l'éta-
lonnage de ce sérum, faisant alors à la *floculation*
du complexe toxine-antitoxine la place importante
que lui assigne son très grand intérêt pratique.

CHAPITRE I

Toxicité du Bacille dysentérique de Shiga

En décrivant le bacille de la dysenterie qui porte son nom. Shiga ne s'est surtout rendu compte de la toxicité de ce germe que par l'inoculation d'une culture tuée qu'il se fit à lui-même, en 1898. Le pouvoir toxique pouvait, en effet, être confondu avec le pouvoir pathogène dans les expériences qu'il avait fait alors sur la souris, le cobaye, le lapin, le chat, le chien, la poule et le pigeon avec des cultures vivantes. Après une injection de 0 cc. 8 d'une émulsion de bacilles tués par un chauffage de 20 minutes à 60° Shiga ressent des symptômes généraux : fièvre (38°6), courbature générale, céphalée ; et des troubles locaux (œdème douloureux puis abcès aseptique). Il note « que son bacille est beaucoup plus toxique vis-à-vis de l'homme que le bacille de la fièvre typhoïde ou le vibron cholérique ». En 1901,

KRUSE, essayant d'immuniser de petits animaux au moyen de cultures jeunes stérilisées par un chauffage d'une heure entre 55° et 60°, voit ses animaux mourir rapidement. Il en conclut : « que la culture contient probablement un poison très actif pour le lapin et le cobaye ». CONRAD, le premier, obtient en 1903, des effets toxiques indiscutables avec un liquide d'autolyse d'une culture sur gélose. Ce liquide, dépourvu de germe, injecté à la dose de 0 cc. 2 dans la veine de l'oreille d'un lapin, le tue en 48 heures.

NEISSER et SHIGA ne tardent pas à confirmer cette découverte, ainsi que VAILLARD et DOPTER. Enfin, ROSENTHAL réussit à obtenir un filtrat de culture en bouillon de trois semaines d'une toxicité très nette. La dose de 0 cc. 1 injectée dans la veine tue en effet un lapin de 2 kgr. en 24 à 48 heures. Le bacille de Shiga est donc toxigène. Avant d'aborder l'étude de ce pouvoir nous devons examiner les lésions qu'il provoque afin de reconnaître, dans les expériences ultérieures, la part des lésions spécifiques et la part des lésions non spécifiques, le cas échéant.

Toutes nos expériences ayant été faites sur le lapin « animal réactif », nous ne nous occuperons ici que de cet animal.

C'est à Dopter que nous devons le premier et le meilleur travail sur l'intoxication expérimentale par le bacille de Shiga. En 1903, en collaboration avec Vaillard, cet auteur nous décrit ainsi les symptômes : « élévation de température, abatte-

ment, diarrhée muqueuse, paralysie du train postérieur, parfois des quatre membres, puis hypothermie, mort en 4 à 6 jours » ; l'anatomie pathologique macroscopique : « un liquide diarrhéique remplit l'intestin grêle ; le colon est tapissé de glaires souvent sanglantes. Presque tout l'intestin paraît altéré mais les lésions principales siègent dans le colon, au voisinage du cœcum : OEdème pâle, gélatineux, gros épaissement de la muqueuse. Tuméfaction oedémateuse, hyperémie et suffusions hémorragiques localisées ou diffuses ; aspect de veours rouge sombre, petits foyers de nécrose et ulcérations punctiformes, glaires épaisses ». L'examen de la muqueuse au microscope montre : « Desquamation du revêtement épithélial, hypersécrétion des glandes tubulaires, épaissement du tissu adénoïde par infiltration de plasma, de leucocytes et de globules rouges, hyperémie considérable des vaisseaux, altération de leur paroi, extravasations sanguines dans le tissu inter et sous-glandulaire de la muqueuse et la portion supérieure de la celluleuse. OEdème de la celluleuse, îlots de nécrose pouvant atteindre la base des glandes ».

En 1905, Dopter publie un nouveau travail dans lequel il étudie, le premier encore, les lésions du système nerveux. Ayant constaté les paralysies dans 75 à 80 % des cas, il note : « qu'elles débute le troisième jour après l'inoculation sous-cutanée, que ce sont habituellement des paraplégies avec paralysie vésicale à marche généralement ascendante quoi-

qu'il se produise parfois l'inverse. Parfois hémiplegie spinale. Pas de troubles sensitifs. L'étude histologique montre l'intégrité absolue des nerfs périphériques et des racines rachidiennes. La moelle est au contraire le siège d'altérations. Parfois lésions diffuses, surtout de la région lombaire, mais pouvant envahir toute la moelle, intéressant l'axe gris seul et presque exclusivement les cornes antérieures. Etat chromophilique des éléments cellulaires et chromatolyse. Dilatation vasculaire hyperémique marquée. D'autres fois, foyers de ramollissements des substances grises, des cornes antérieures pouvant envahir même les centres protubérantiels ; lésions de nécrose, fibres myéliniques brusquement interrompues, parfois envahissement des cordons blancs par les foyers de nécrose, vaisseaux dilatés à l'extrême, bourrés des éléments normaux du sang, sans altération de leur paroi, hémorragies interstitielles ».

Les symptômes et lésions ainsi décrits ont toujours été retrouvés à des degrés divers par la suite et ce serait tomber dans des redites inutiles que d'exposer ici nos propres recherches à ce sujet.

CHAPITRE II

De la Toxicité des milieux de Cultures liquides privés de leurs Germes

Ce chapitre étant le plus important de ce travail doit, pour rester clair, être divisé en autant de paragraphes qu'il y a de conditions du problème. Nous exposerons ainsi tous les travaux faits avant nos propres recherches. Nous appuyant alors sur les faits acquis nous présenterons notre travail personnel qui s'étend sur les points qui, à notre avis, ne furent point mis en lumière par nos prédécesseurs.

A. DU RÔLE DE LA CONCENTRATION EN IONS H LIBRES DANS LE MILIEU

ROSENTHAL, en 1903 et 1904, obtient le premier des effets toxiques avec un filtrat de culture en bouillon. Cet auteur écrit : « Le meilleur milieu est un bouillon Martin légèrement alcalin. Avec une réaction acide, neutre, ou très alcaline nous n'obtenons que très peu de toxine ».

TODD, en 1904, dit que plus le milieu est alcalin, plus la toxine est active. KLEIN, reprenant ces expériences en 1906, conclut à la possibilité de la formation d'un voile en bouillon Martin légèrement alcalin et obtient ainsi, plus rapidement un liquide aussi toxique que les filtrats des auteurs précédents. LUDKE, la même année, après avoir essayé divers milieux, conclut que les résultats les plus favorables ont été obtenus avec des bouillons alcalins.

DOERR, apporte plus de précision et publie, en 1906 également, que : « Pour obtenir l'optimum de toxine il faut ajouter au bouillon neutre 30 cc. de NaOH à 10 % par litre ». En 1907, cet auteur publie un ouvrage mettant la question au point. Depuis ce travail des méthodes nouvelles de dosage de la réaction des milieux ont permis d'y apporter plus de rigueur mais le principe ainsi que les résultats n'en ont été que confirmés.

DOERR répartit un même milieu dans des flacons semblables. Il en acidifie un, neutralise un second et alcalinise un troisième (indicateur : phénolphtaléine). Il constate qu'après divers temps de culture, c'est toujours le milieu alcalin qui est le plus toxique. Poursuivant ses recherches, il prépare une grande quantité de bouillon qu'il amène à la neutralité (indicateur : phénolphtaléine), puis répartit également son milieu dans cinq ballons. Dans le ballon A il ajoute 1 gr. de NaOH par litre, dans le ballon B 3 gr., dans le ballon C 4 gr., dans le ballon D 6 gr. et dans le ballon E 10 gr. Tous sontensemencés de la même façon et mis à 37°. Des prélè-

vements sont faits à différentes dates et les doses mortelles optima des filtrats se montrent les suivantes : pour le milieu *A* : 0 cc. 3 par kilog. d'animal ; pour le *B* : 0 cc. 01 ; pour *C* : 0 cc. 05 et pour *D* : 0 cc. 5. Le ballon *E* ne présenta des traces de culture que longtemps après et son contenu se montra alors complètement atoxique. DOERR conclut : « L'optimum d'alcalinité existe donc quand on ajoute à un bouillon de peptone neutre 3 grammes de NaOH par litre ». FUKUHARA, en 1919, écrit que : « 5 % de soude normale au-delà du point neutre à la phénolphthaléine donne les meilleurs résultats ».

C'est en 1920, que l'on voit pour la première fois intervenir dans la question qui nous intéresse la mesure de la concentration en ions H libres. Mais OLITSKY et KLIGER, s'ils étudient la courbe des variations du « pH » par rapport à la courbe de production de toxine, ne publient pas de recherches sur le « pH » optimum pour l'ensemencement. Ce travail est publié pour la première fois en 1922 par JONESCO-MIHAIESTI et C. POPESCO. Ces auteurs montrent qu'alors que la toxicité est nulle avec les pH inférieurs à 7,5 elle devient nette à partir de 7.6, meilleure encore à 8, et arrive à son maximum à 8,4.

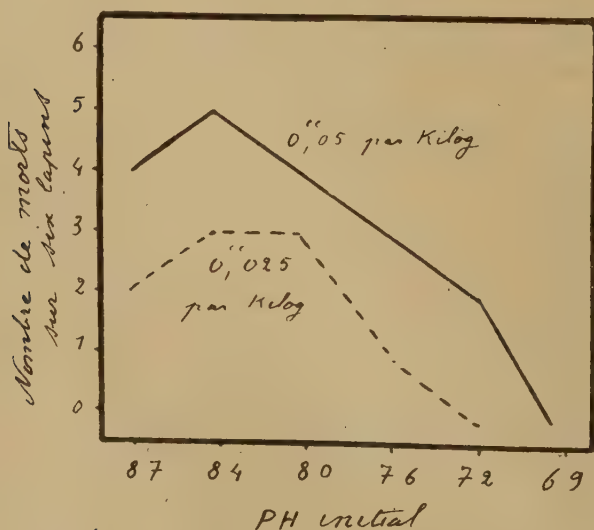
Nous devons toutefois remarquer que ces auteurs ajustent au pH voulu leur milieu avant de le stériliser à 120°, température qui altère assez fortement la réaction.

La même année, HIRSZFELD communique au Comité d'Hygiène de la Société des Nations son « pre-

mier rapport sur la standardisation des sérums antidysentériques ». Nous y trouvons une étude complète de l'influence et des variations du « pH » et nous pouvons en déduire que le pH de 6,4 est mauvais, alors que 7,5 est bon et 8,4 meilleur encore. En 1923, YOSHIOKA trouve également qu'une alcalinité nette est nécessaire, mais il s'exprime en degrés d'alcalinité que nous n'avons pu interpréter.

L'étude de cette question ne peut être mieux close que par cette courbe extraite du « premier rapport sur l'étalonnage du sérum antidysentérique » fait par K. SHIGA, H. KAWAMURA et K. TSUCHIYA pour le Comité d'Hygiène de la Société des Nations en 1924.

Courbe représentant le pourcentage des animaux tués au cours de trois expériences.



Conclusion : L'alcalinité optimum d'un bouillon est au pH 8,4.

★★

B. — DE L'INFLUENCE DU TEMPS DE CULTURE

ROSENTHAL, publiant ses premiers résultats, indique qu'il filtre des cultures de trois semaines. En 1904, il indique qu'un filtrat de culture de 3 jours tue un lapin en *trois semaines* à la dose de 5 cc., que cette dose d'un filtrat de culture de 11 jours est mortelle en 12 heures, et qu'enfin au bout de trois semaines la dose mortelle est de 0 cc. 2 ; 0 cc. 1 en 48 heures pour un lapin de 2 kg. TODD, par contre, obtient ses meilleurs résultats avec des cultures d'un mois à six semaines. KRAUS et DOERR, expérimentant avec plusieurs souches de bacille de Shiga, concluent que : « Cette influence de l'ancienneté des cultures en bouillon sur le contenu de toxine des filtrats est toujours constatée, de sorte que nous n'employons plus maintenant de cultures de moins de trois semaines pour la production de toxine ». KLEIN emploie également des cultures de trois semaines, mais constate que dès le 7^e jour, et même une fois dès le troisième, le filtrat se montre très toxique. LUDKE, en 1906 également, indique que si des filtrats de jeunes cultures se montrent toxiques, les vieilles cultures (4 semaines) le sont davantage.

DOERR, dans son ouvrage « Das Dysenterie-toxin », n'insiste pas sur l'importance du facteur « temps », mais il suffit de jeter un coup d'œil sur les protocoles de ses expériences pour se rendre compte de son influence. Nous voyons en effet que pour le bouillon neutre, additionné de 1 gr. de NaOH, dit bouillon A, le filtrat, après 5 jours, tue à la dose de 2 cc.; que l'échantillon pris après 10 jours tue à la dose de 0 cc. 3, ainsi que celui du 20^e jour. Un filtrat de la culture âgée de 2 mois ne tue plus qu'à la dose de 0 cc. 5. Avec le bouillon B (3 gr. de NaOH en plus de la neutralité), les doses mortelles sont de 0 cc. 1 au bout de 5 jours, 0 cc. 05 au bout de 10 jours et de 0 cc. 01 après 20 jours. Avec le bouillon C (4 gr. de NaOH), les doses sont respectivement de 0 cc. 1 ; 0 cc. 05 et 0 cc. 05. KOLLE, HELLER et de MESTRAL, en 1908, notent qu'un bouillon Martin filtré au bout de 6 jours tue à la dose de 2 cc. ; filtré au bout de 10 jours, la dose s'abaisse à 0 cc. 5 ; au bout de 15 jours, elle atteint 0,25 et reste la même au 20^e jour. La toxicité diminue ensuite peu à peu.

M. NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU, en 1916, trouvent qu'avec le bouillon Martin simple ou glucosé à 0,2 %, la concentration de toxine maximum existe au bout de 10 à 12 jours.

OLITSKY et KLIGLER, en 1920, publient les résultats suivants :

Filtrat d'une culture de 3 jours . dose mortelle :
1 cc.

Filtrat d'une culture de 4 jours : dose mortelle :

1 cc.

Filtrat d'une culture de 5 jours : dose mortelle :

0.5.

Filtrat d'une culture de 7 jours : dose mortelle :

0.5.

Filtrat d'une culture de 14 jours : dose mortelle :

0.25.

Filtrat d'une culture de 21 jours : dose mortelle :

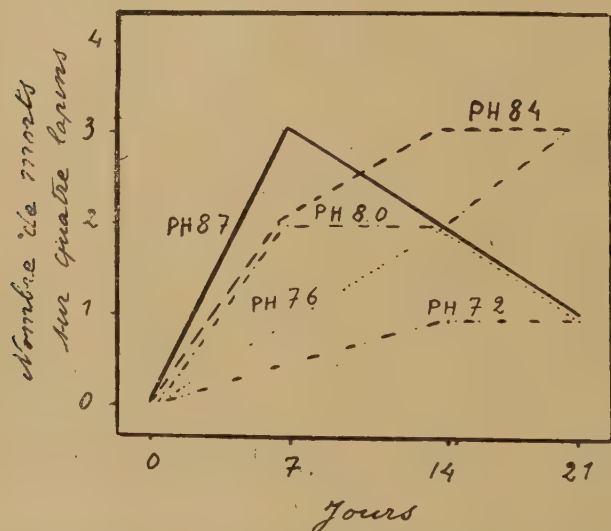
0.25.

HIRSZFELD nous montre un fait important dont les travaux de DOERR nous avaient déjà donné un aperçu : *Le rôle du temps d'incubation est en rapport étroit avec l'alcalinité du bouillon. Plus celle-ci se rapproche de l'optimum, moins il faut de temps pour obtenir la toxicité maximum* (1). Une culture de pH initial de 6,4 ne donne un filtrat toxique qu'au bout de 20 jours alors qu'avec les pH de 7.5 et de 8.4 les effets sont déjà nets après 8 jours.

Ceci explique du même coup les divergences observées entre les résultats des auteurs précédemment cités. Les bouillons de TODD, toxiques seulement après 6 semaines étaient certainement moins alcalins que ceux de KLEIN agissant dès le 3^e et 7^e jour. YOSHIOKA, faisant des essais avec différents milieux et différents degrés d'alcalinité, conclut que la culture de 3 semaines est plus propice que celle de 1 à 2 semaines.

(1) C'est la raison pour laquelle nous avons placé l'étude de la réaction du milieu avant toute autre.

Nous terminerons encore cet exposé par un tableau emprunté au 1^{er} rapport de Shiga ; tableau indiquant nettement le rôle du temps, en combinaison avec le « pH ».



CONCLUSION : Les cultures en bouillon de pH 8.4 (optimum) doivent être filtrées au bout de deux semaines.

★★

C. DE L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

ROSENTHAL note dès 1903, que la température optimum est 36-37°. LUDKE, ayant essayé de basses températures n'a pas eu à s'en louer et adopte celle de 37°. M. NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU trouvent que la fonction toxigène du bacille de Shiga est peu

ou pas influencée par les températures élevées (de 42 à 47°). Enfin en 1924 Shiga montre que le filtrat d'une culture de 2 semaines à 32° est moins toxique que celui de la culture faite à 37°.

★ ★

D. — DE L'INFLUENCE DE L'AÉRATION

Dès ses premiers essais, ROSENTHAL constate que l'aérobiose est nécessaire et qu'en anaérobiose, le bacille de Shiga est beaucoup moins toxigène. LUDKE obtient ses meilleurs résultats avec des bouillons répartis dans des récipients tels que le liquide offre une grande surface.

DOERR signale qu'il met 2 litres de bouillon dans un ballon de 5 litres afin de permettre une large aération.

Il faut attendre l'année 1919 pour trouver une étude détaillée de la question. OLITSKY et KLIGLER, s'ils interprètent leurs résultats d'une façon spéciale que nous discuterons ultérieurement, n'en n'ont pas moins des résultats très nets :

Ces deux auteursensemencent deux ballons contenant chacun 500 cc. de bouillon. L'un est fait de telle sorte que le liquide présente une surface de 17 cm. de diamètre et n'a que 2 cm. de profondeur.

L'autre n'a que 7 cm. de diamètre, mais sa profondeur est de 9 cm.

Les filtrats des cultures de 7 jours donnent les résultats suivants chez le lapin :

Vase profond 0 cc. 05 intraveineux, pas d'effet.

Vase profond 0 cc. 10 intraveineux, paralysie en 4 jours.

Vase profond 0 cc. 5 intraveineux, paralysie en 2 jours.

Vase plat 0 cc. 01 intraveineux pas d'effet.

Vase plat 0 cc. 1 intraveineux, paralysie en 2 jours.

Vase plat 0 cc. 05 intraveineux, paralysie en 1 jour.

OLITSKY et KLIGLER arrivent même, par la suite, à agiter leurs cultures de temps en temps pour provoquer une plus grande aération.

Enfin, tout récemment (octobre 1925), MARRIAN PERRY et COPPINGER, répétant les expériences de Mc CARTNEY et OLITSKY, obtiennent, avec des cultures de 3 jours en couche mince, un filtrat tuant à la dose de 0 cc,2, alors que la culture en anaérobie donne un filtrat qui ne tue pas le lapin à la dosé de 2 cc.

*
**

E. — DE L'INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU MILIEU ET EN PARTICULIER DE LA QUALITÉ DE PEPTONE

ROSENTHAL obtint un filtrat toxique en cultivant le bacille de Shiga sur bouillon Martin. Ce bouillon est composé d'un mélange à parties égales d'une

macération de viande de veau et d'une peptone préparée par digestion artificielle de panse de porc. L'auteur indique que l'addition de liquide d'ascite n'a pas d'influence. KLEIN indique également qu'il se sert du bouillon Martin.

Ludke essaie un milieu sans albumose ni peptone :

Asparagine	4
Lactate d'Ammoniaque	6
Phosphate neutre de soude	2
Chlorure de sodium	5
Eau	1000

mais n'obtient pas de filtrat toxique. L'addition de leucine, de glyocolle, provoque également une baisse de toxicité. Le même auteur a obtenu un liquide toxique en utilisant une macération de cerveaux de mouton et de bœuf dans l'eau physiologique filtrée et non chauffée avant ensemencement, mais il dut reconnaître que le bouillon ordinaire bien alcalinisé lui donnait de meilleurs résultats.

DOERR emploie un bouillon avec *peptone de Witte*.

KOLLE, HELLER et de MESTRAL, ayant essayé le bouillon Martin et un bouillon qu'ils qualifient d'« ordinaire », sans en indiquer la formule, en concluent « que le choix du genre de bouillon n'est pas d'une importance décisive ». M. NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU utilisent le bouillon Martin simple ou glucosé à 0,2 %, mais n'indiquent pas lequel

leur a donné les meilleurs résultats. FUKUHARA fait ses cultures dans un mélange de peptone de panse et de décoction de viande, cette dernière préparée en faisant bouillir de la viande (?) hachée en présence d'acide acétique pour détruire le sucre musculaire (?).

OLITSKY et KLIGLER, en 1920, comparent deux milieux. Le premier, simple infusion de viande, donne au bout de 5 jours un filtrat tuant à la dose d'1 cc. Le second, infusion de viande additionnée d'1/3 de son volume d'une solution d'albumine d'œuf à 10 %, tue à la dose de 0 cc,5 après filtration au cinquième jour de la culture. Par ailleurs, ces deux auteurs publient des courbes montrant que la production de toxine est plus rapide dans un bouillon non privé de sucre musculaire que dans un bouillon qui en est dépourvu. JONESCO-MIIAESTI et POPESCO font bouillir durant 1 h. 30 500 grammes de viande de veau très fraîche dans un litre d'eau, filtrent sur toile, ajoutent 3 gr. de NaCl, 2 gr. de phosphate de Na et 15 gr. de peptone Byla par litre, reportent à l'ébullition 30 minutes, alcalinisent au pH voulu, filtrent sur papier et stérilisent. En 1923, OLITSKY et Mc CARTNEY abandonnent le bouillon à l'albumine pour un bouillon peptoné à 2 % et font des cultures anaérobies avec du bouillon additionné de dextrose. En même temps, Yoshioka compare quatre milieux différents.

Milieux	Dose mortelle du filtrat d'une culture de trois semaines
1° bouillon + 2 % de peptone de Witte...	0,0025
2° milieu de Fukuhara + 1 % de peptone de Witte.....	0,005
3° Bouillon de viande acétique + 2 % de peptone de Witte, ne tue pas à.....	0,01
4° bouillon + 2 % de peptone de Shiona..	0,008

HIRSZFELD et PRZESMYCKI, dans leur deuxième rapport à la Société des Nations, publient des essais de différents milieux : bouillon de bœuf + 2 % de peptone Chapoteaut et bouillon fait avec une macération de viande de cheval et 1 % de peptone de Witte, mais les changements de souche de bacille de Shiga ne permettent pas d'en tirer un enseignement. Enfin, SHIGA, dans son travail de 1924, utilise un milieu fait de la façon suivante :

« Faire bouillir 500 gr. de viande de cheval dans 1000 cc. d'eau ; filtrer. Ajouter 10 gr. de peptone de Teruuchi et 5 gr. de sel, chauffer jusqu'à dissolution. Ajouter KOH pour rendre le milieu alcalin : filtrer alors à nouveau. Stériliser ». Mais dans cette étude si approfondie nous pouvons aussi trouver le premier travail important sur : « Les relations entre la production de toxine dysentérique et les qualités des peptones employées dans le milieu ». Toutes autres conditions égales, SHIGA expérimente les peptones suivantes :

1° Peptone de Teruuchi (caséine) dose mortelle	0 cc,025
2° Peptone de Witte dose mortelle.....	0 cc,05
3° Peptone de Riba (préparée avec de la chair de poisson), dose mortelle.....	0 cc,05
4° Peptone d'albumine de sérum (préparée avec du sérum de cheval) dose mortelle	0 cc,05
5° Peptone de fibrine (préparée avec de la fibrine de sang de cheval, digérée avec de la trypsine), dose mortelle.....	0 cc,025
6° Peptone de globuline de sérum (sérum de cheval digéré), dose mortelle.....	0 cc,05
7° Peptone de légume (fèves digérées avec de la trypsine), dose mortelle.....	0 cc,1
8° Peptone Chapoteaut, dose mortelle....	0 cc,005

Et SHIGA en conclut :

« Les résultats des expériences faites ci-dessus montrent que les peptones de Teruuchi et de fibrine sont un peu supérieures aux autres peptones. La peptone Chapoteaut, cependant, donne les meilleurs résultats mais la rareté du matériel ne nous a pas permis de répéter l'expérience pour en confirmer les résultats ».

En ce qui concerne l'influence du milieu nous ne pouvons tirer des renseignements de valeur que de ce dernier travail, les autres n'ayant pas une valeur comparative réelle soit parce qu'ils ont été faits sur une trop petite échelle, soit parce que l'alcalinité

n'était pas la même dans les divers milieux, soit encore parce que les différentes cultures n'ont pas été faites avec les mêmes souches.

Et cette remarque nous amène tout naturellement à étudier la question :

*
**

F. DU RÔLE DES SOUCHES DE BACILLES DE SHIGA

R. KRAUS et DOERR, en 1906, écrivent : « L'intensité de formation de toxine ne dépend pas seulement de l'ancienneté des cultures mais aussi, à un haut degré, de la race dont il s'agit. Nous avons obtenu les plus fortes toxines avec la souche Kruse II. Nous possédons actuellement aussi un fort producteur de toxine dans une race provenant d'une épidémie de Galicie orientale ». FUKUHARA, en 1919, publie à son tour : « Toute souche n'est pas bonne pour préparer une toxine soluble ; sur 10 souches examinées une seule donna satisfaction ».

Voici terminée cette étude des travaux faits avant que nous ayons entrepris les nôtres. Quels enseignements pratiques devons-nous en tirer et dans quelles voies encore incertaines devons-nous nous engager ?

Nous avons appris que : 1°) l'alcalinité du milieu liquide doit correspondre au pH de 8,4 ;

2°) Les cultures doivent être filtrées au bout de deux semaines ;

3°) Les cultures doivent se faire à 37° ;

4°) Les milieux doivent offrir une large surface d'aération.

5°) La peptone Chapoteaut donne les meilleurs résultats.

6°) Les souches étant très différentes les unes des autres au point de vue toxigène les essais comparatifs doivent toujours être faits avec la même souche.

Il nous a alors semblé que deux éléments du problème restaient à éclaircir :

1°) Quelle est la quantité optimum de peptone Chapoteaut à ajouter au bouillon ?

2°) Quel est le meilleur bouillon ?

★★

G. DE L'INFLUENCE DE LA PROPORTION DE PEPTONE CHAPOTEAUT

Avant de rendre compte de nos essais, qu'il nous soit permis d'exposer rapidement nos méthodes de travail :

Le rôle de la concentration en ions H nous semblant capital notre premier soin fut de construire nous-même une échelle colorimétrique selon la méthode de CLARKE exposée si clairement en 1923 par ABT. Nous n'avons eu qu'à nous féliciter de cela car si DOERR put trouver l'alcalinité optimum par d'autres moyens, il nous semble impossible, sans l'estimation du PH, de faire des essais comparatifs de va-

leur lorsque l'on fait varier des facteurs d'acidité potentielle variable.

Ainsi, par exemple, pour ajuster au PH 8,4 deux milieux dont l'un contient 1 % de peptone Chapoteaut et l'autre 2,5 % il faudra, la neutralité une fois atteinte, bien plus de NaOH pour le second que pour le premier. Seule la mesure de concentration en ions H permet de mettre rapidement ces deux milieux au même PH. Cette méthode permet également d'apprécier et de corriger les perturbations causées par la stérilisation. C'est grâce à elle que nous pouvons nous rendre compte que la baisse d'alcalinité par chauffage à 120° est d'autant plus grande que le PH est plus élevé. Quel autre moyen nous eût permis de constater que les bouillons faits avec de la viande fraîche perdent davantage d'alcalinité que ceux qui sont faits avec de la viande macérée, du fait de la stérilisation?

Chaque série d'essai a été faite de telle sorte qu'un seul facteur varie. Les divers milieux furent tous faits par nous-même et le même jour. L'alcalinisation ajustée de telle sorte qu'elle soit rigoureusement la même dans tous les milieux au moment de l'ensemencement ; cela fut d'ailleurs vérifié chaque fois. Les milieux furent toujours répartis en quantités égales dans des récipients semblables afin de présenter la même surface et la même profondeur.

Lesensemencements furent tous faits avec la même souche (n° 30, dite DOPTEP) ensemencée à nouveau 24 heures auparavant dans un ballon de bouil-

lon dont nous répartissions des quantités égales dans chacun de nos milieux en expérience.

Les cultures, ensemencées en même temps, furent toujours placées à la température constante de 37° et furent toujours filtrées simultanément.

Ceci dit, passons à nos essais :

Le 11 août 1925, nous établissons cinq milieux différents :

1° Eau peptonée (50 gr. de peptone Chapoteaut pour un litre d'eau).

2° Bouillon de bœuf (1000 gr. de viande de bœuf frigorifiée, sans graisse ni aponévrose, mise dans 1000 cc. d'eau, laissée à la température ambiante durant 24 heures puis portée à l'ébullition. Filtration sur papier), additionné d'une partie égale à son volume d'eau peptonée à 5 % (cela équivaut à un bouillon ordinaire peptoné à 2,5 %).

3° Bouillon de bœuf (comme ci-dessus) additionné de moitié de son volume d'eau peptonée à 5 % et de moitié de son volume d'eau.

(Soit un bouillon ordinaire peptoné à 1,25 %).

4° Bouillon de bœuf additionné du quart de son volume d'eau peptonée et des trois quarts de son volume d'eau (bouillon peptoné à 0,625 %).

5° Bouillon de bœuf (toujours la formule ci-dessus).

Tous ces milieux, répartis à raison de 200 cc. dans des ballons de 350 cc., furent ajustés au PH8 au mo-

ment de l'ensemencement qui fut fait à raison de 1 cc. d'une culture de 24 heures par ballon.

Le 26 août 1925 ces milieux furent filtrés d'abord sur papier puis sur bougie Chamberland F ; le PH en fut mesuré et le dosage effectué sur le lapin, par injection intraveineuse.

Voici les résultats obtenus :

MILIEUX	PH initial	PH à la filtration	DOSE MORTELLE par kg. d'animal
1) Eau peptonée à 50 ‰	8	8,4	0 cc. 1
2) Bouillon peptoné à 25 ‰	»	8,8	0 cc. 015
3) Bouillon peptoné à 12,5 ‰	»	8,2	0 cc. 5
4) Bouillon peptoné à 6,25 ‰	»	8,2	1 cc. 2
5) Bouillon simple non pep.	»	8,2	2 cc.
Voir le protocole d'expérience n° I			

Le tableau ci-dessus montre nettement qu'une proportion de peptone plus grande que celle que l'on ajoute ordinairement donne de meilleurs résultats. Toutefois nous ne pouvions conclure que la proportion de 2,5 % était l'optimum faute d'avoir essayé des proportions plus grandes encore.

C'est pourquoi nous nous sommes livrés à un deuxième essai :

Nous avons, par des moyens identiques à ceux de la première expérience, établi les trois milieux suivants :

1°) Macération peptonée à 20 o/oo.

2°) Macération peptonée à 40 o/oo.

3°) Macération peptonée à 60 o/oo.

Ces milieux furent alcalinisés de telle sorte qu'ils présentent le PH 8,4, au moment de l'ensemencement.

Ils furent répartis dans des fioles de Fernbach à raison d'un litre par récipient. Le diamètre de la surface était de 20 cm. et la profondeur de 3 cm. 5 environ.

L'ensemencement fut effectué le 1^{er} septembre 1925 avec 5 cc. de culture de 24 heures par fiole de Fernbach. La filtration fut faite le 16 septembre.

En voici les résultats :

MILIEUX	PH initial	PH à la filtration	DOSE MORTELLE par kg. d'animal
Macération peptonée à 2 o/o	8,4	8,8	0 cc. 008
Macération peptonée à 4 o/o	»	8,6	0 cc. 01
Macération peptonée à 6 o/o	»	8,5	0 cc. 016
Voir le protocole d'expérience n° II			

Nous pouvons donc conclure que la proportion optimum de peptone Chapoteaut se trouve entre 20 et 30 o/oo.

Pour nos expériences ultérieures nous avons adopté la proportion de 25 o/oo.

II. DU ROLE DE LA COMPOSITION DU BOUILLON

Nous avons voulu chercher quel était, parmi les viandes faciles à se procurer, la plus appropriée au but que nous poursuivions.

Pour cela, nous sommes allé acheter nous-même, afin d'être certain de sa fraîcheur, de la viande de cheval, de bœuf et de veau. De plus, nous avons voulu essayer de la chair de poisson et nous avons cherché un poisson d'assez grande taille donc facile à débarrasser de ses déchets, écailles et arêtes, et facile à se procurer en toutes saisons à un prix accessible aux laboratoires. Nous avons porté notre choix sur la dorade. (Nous n'avons pas la prétention d'avoir jugé par là la valeur de tout milieu à base de poisson et nous sommes persuadés qu'il y a au moins autant de différence entre la chair de la dorade et celle du merlan qu'il y en a entre la viande de bœuf et la viande de cheval. Nous n'avons voulu tirer de cet essai qu'une indication; et seul le point de vue pratique a guidé notre choix).

Nous avons, après avoir éliminé tout ce qui n'était pas chair musculaire, divisé chacune de nos viandes en deux lots. L'un fut, à raison de 500 gr. pour un litre, porté immédiatement à ébullition sur un feu doux, laissé refroidir une demi-heure, reporté à ébullition, puis filtré. La *décoction* ainsi obtenue fut additionnée de peptone Chapoteaut (2,5 %) et alcalinisée de telle sorte qu'elle présente, après stérilisa-

tion et précipitation de 10 minutes à 120°, le PH de 8.4.

Après cette stérilisation, les milieux furent filtrés et répartis dans des fioles de Fernbach. Le PH vérifié et réajusté au besoin. Une deuxième stérilisation de 20 minutes à 110° fut effectuée et le PH vérifié une seconde fois (la deuxième stérilisation ne le modifie pas à condition qu'elle soit faite à une température inférieure à la première et que l'alcalinité ne soit pas, dans l'intervalle, portée à un degré plus élevé que le PH initial).

Le deuxième lot, placé dans des récipients à raison de 500 gr. de viande pour un litre d'eau, fut soumis à une macération de 24 heures à la température de 30°. Ces *macérations* furent ensuite bouillies et traitées comme les divers lots de viandes fraîches.

Nous avons obtenu ainsi les huit milieux suivants :

- 1°) Décoction de cheval peptonée à 25 0/00.
- 2°) Macération de cheval peptonée à 25 0/00.
- 3°) Décoction de bœuf peptonée à 25 0/00.
- 4°) Macération de bœuf peptonée à 25 0/00.
- 5°) Décoction de veau peptonée à 25 0/00.
- 6°) Macération de veau peptonée à 25 0/00.
- 7°) Décoction de dorade peptonée à 25 0/00.
- 8°) Macération de dorade peptonée à 25 0/00.

Tous ces milieux ensemencés selon la technique habituelle furent filtrés au bout de deux semaines (le 20 septembre).

Les résultats furent les suivants :

MILIEUX	PH initial	PH à la filtration	DOSE MORTELLE par kg. d'animal
1) Décoction de cheval . . .	8,4	8,8	0 cc. 005
2) Macération de cheval . .	»	8,6	0 cc. 01
3) Décoction de bœuf.	»	8,7	0 cc. 008
4) Macération de bœuf.	»	8,4	0 cc. 025
5) Décoction de veau.	»	8,9	0 cc. 01
6) Macération de veau.	»	8,6	n'a pas tué à 0 cc. 025
7) Décoction de dorade . . .	»	8,6	0 cc. 025
8) Macération de dorade. . .	»	8,4	0 cc. 025
Voir le protocole d'expérience n° III			

De ce tableau il ressort : 1° que les décoctions sont supérieures aux macérations ; 2° que la décoction de cheval est supérieure aux autres.

Toutefois, si l'on tient compte de ce que DOERR, OLITSKY et KIGLER, JONESCO, MIHAESTI et C. POPEȘCO, ainsi que HIRSZFELD et SHIGA ont signalé que le degré d'alcalinité terminal est un bon indicateur de la toxicité et si, nous reportant aux protocoles d'expérience, nous relevons que le lapin qui a reçu 0,005 de filtrat de décoction de veau (par kg) a été très près de la mort, nous devons en conclure que cette décoction est au moins aussi toxigène que la décoction de cheval. Une nouvelle expérience s'imposait :

Nous en avons profité pour étudier du même coup si une concentration plus forte de nos décoctions serait susceptible de donner de meilleurs résultats.

Quatre milieux furentensemencés :

1°) Décoction de viande de cheval ordinaire (500 gr. pour 1000 cc. d'eau) peptonée à 2,5 %.

2°) Décoction de viande de cheval concentrée (1000 gr. pour 1000 cc. d'eau) peptonée à 2,5 %.

3°) Décoction de viande de veau ordinaire peptonée à 2,5 %.

4°) Décoction de viande de veau concentrée peptonée à 2,5 %.

La filtration fut effectuée au bout de deux semaines (le 7 novembre) et les dosages donnèrent les résultats suivants :

MILIEUX	PH initial	PH à la filtration	DOSE MORTELLE par kg. d'animal
Décoction de cheval non concentrée	8,4	8,3	0 cc. 025
Décoction de cheval conc.	»	8,7	0 cc. 025
Décoction de veau non concentrée	»	8,7	0 cc. 008
Décoction de veau concent.	»	8,6	0 cc. 008
Voir le protocole d'expérience n°-IV			

Ce nouveau dosage tranche nettement en faveur de la viande de veau et montre que la viande de cheval fournit des résultats plus irréguliers. Nous voyons en même temps qu'il n'y a pas intérêt à concentrer nos décoctions.

Nous avons, avant de clore ce travail, voulu jeter un coup d'œil sur l'influence de certains corps ajou-

tés au bouillon. Nous avons pour cela préparé les milieux suivants :

1°) Décoction de veau peptonée à 2,5 % (témoin).

2°) Décoction de veau peptonée à 2,5 %, additionnée de 5 gr. de phosphate acide de potassium et de 2 gr. de citrate de soude (ce dernier corps pour empêcher la précipitation du phosphate par Na OH au moment de l'alcalinisation).

3°) Décoction de veau peptonée à 2,5 % additionnée de 5 gr. de chlorure de sodium.

4°) Décoction de veau peptonée à 2,5 % additionnée de 20 gr. de tapioca.

L'essai de tapioca nous fut inspiré par M. Ramon.

Les quatre milieux filtrés le 3 décembre après 2 semaines de culture furent immédiatement dosés in vivo.

MILIEUX	PH initial	PH à la filtration	DOSE MORTELLE par kg. d'animal
Décoction de veau	8,4	8,5	0 cc. 013
Décoction de veau + phosphate de K + citrate de Na	»	8,7	0 cc. 007
Décoction de veau + Cl Na	»	8,5	0 cc. 015
Décoction de veau + tapioca	»	6,2	0 cc. 015
Voir le protocole d'expérience n° V			

L'addition de phosphate acide de potasse semble donc être favorable à la toxicité du filtrat, alors que le chlorure de sodium n'a aucun effet.

En ce qui concerne le tapioca, ce milieu de consistance épaisse a fourni une culture intense dès les premiers jours, puis celle-ci a semblé s'arrêter alors que le milieu est devenu si fluide qu'il a été, au 15^e jour, aisément filtré sur bougie Chamberland F. De ce fait et de la réaction qui reste à la phase d'acidité, nous pouvons penser qu'en filtrant plus rapidement un semblable milieu, nous obtiendrions peut-être un filtrat très toxique.

CONCLUSIONS DU 2^e CHAPITRE

Pour obtenir la toxicité la plus grande d'une culture en milieu liquide, nous devons composer ce dernier de la façon suivante :

Décoction de viande de veau bien fraîche, additionnée de 25 grammes de peptone Chapoteaut, de 5 gr. de phosphate monopotassique et de 2 gr. de citrate de soude. La réaction de ce milieu doit être établie de telle sorte qu'elle soit égale au pH 8,4 au moment de l'ensemencement. Le milieu doit être placé dans un récipient tel que le liquide offre une large surface d'aération.

Ce milieu, assez largementensemencé, présente toujours dès le 3^e ou 4^e jour un voile de culture épais, gris-blanchâtre, qui tombe au fond et se renouvelle plusieurs fois durant le temps de séjour à 37°, qui doit être de deux semaines.

La formation de ce voile, dont KLEIN, le premier, a signalé l'apparition, est, comme l'ont dit DOERR, KOLLE, HELLER et DE MESTRAL, un excellent indicateur de la production de toxines.

Nous avons vu plus haut que l'alcalinité est un bon moyen d'appréciation de la toxicité d'un filtrat ; or, le PH de notre milieu est toujours revenu à son point de départ dans le délai de quinze jours et l'a même le plus souvent dépassé.

Nous disposons à l'heure actuelle d'un troisième moyen d'estimer *in vitro* la valeur d'un filtrat toxique. Nous voulons parler de la réaction de floculation qui nous retiendra à la fin de ce travail, lorsque nous aurons étudié le deuxième élément nécessaire à son obtention : le sérum antidysentérique.

CHAPITRE III

De la Toxicité des Cultures tuées

Nous avons vu, dès le début de ce travail, que SMIGA, en 1898, s'injecta sous la peau une émulsion d'une culture de 24 heures sur gélose tuée par un chauffage de 20 minutes à 60° et en ressentit les effets toxiques. Trois ans plus tard, KRUSE constate que des cultures fraîches stérilisées par une heure de chauffage à 55° étaient très toxiques pour les petits animaux de laboratoire, et même pour l'homme (culture en bouillon). CONRADI, cultivant le bacille de SMIGA sur un bouillon de viande peptoné légèrement alcalin, solidifié par addition de 3 % de gélose, tue un lapin de 2 à 3 kgr. en trois jours, par injection de 2 mgr. d'une culture de 24 heures tuée par addition de chloroforme. VAILLARD et DOP-TER signalent également qu'il est possible de tuer les animaux avec des phénomènes typiques au moyen de cultures tuées par la chaleur. KRAUS et DOERR obtiennent des résultats analogues. KOLLE,

HELLER et DE MESTRAL émulsionnent dans 120 cc. d'eau physiologique la récolte de 6 gros flacons de gélose, stérilisent cette émulsion par un chauffage de 2 heures à 58° et arrivent à tuer le lapin à la dose de 0 cc. 007 par inoculation intraveineuse. Il est vrai que cette émulsion devait ressembler fort à une purée de microbes. En 1910, SELTER, chauffant à 60° durant une heure une culture de 24 heures sur gélose émulsionnée dans 10 cc. d'eau physiologique, tue le lapin par injection intraveineuse de 0 cc. 25. M. NICOLLE, DEBAINS et LOISEAU, en 1916, cultivent le bacille de SHIGA sur un milieu fait de bouillon de viande, de pomme de terre et de peptone Chapoteaut, solidifié à l'aide de gélose, et notent que le chauffage à 55°, durant 30 minutes, n'atténue pas l'action toxique d'une émulsion de cette culture. BESREDKA, en 1919, montre que non seulement une émulsion de bacilles de Shiga tués par chauffage d'une heure à 60° est très toxique pour le lapin, lorsque une faible dose lui est injectée par la voie veineuse, mais que l'ingestion d'un quart de la culture d'une boîte de Roux, tuée de la même façon, fait régulièrement périr l'animal. Enfin, IONESCU-MIHAIESTI et COMBIESCU adressent, en 1924, un rapport à la Société des Nations, dans lequel nous voyons que des corps microbiens tués par la chaleur, broyés et dilués très largement, sont hautement toxiques pour le lapin. O'BRIEN procède de la même façon, ainsi que TARASSEVITCH.

Nous nous contenterons de conclure de ce très court chapitre qu'un bon moyen d'obtenir des effets toxiques spécifiques consiste à employer des cultures tuées par chauffage d'au moins 30 minutes à 55-60° ou stérilisées par addition d'un produit chimique approprié. Nous attendons d'avoir étudié le prochain chapitre pour faire la remarque importante qui s'impose.

CHAPITRE IV

De la Toxicité des Produits d'Autolyse et de Lavage des Cultures sur milieu solide

C'est à CONRADI que nous devons la démonstration de l'action toxique du produit de l'autolyse aseptique des bacilles de SHIGA. Cet auteur cultive le bacille sur la surface d'une gélose nutritive dont nous avons donné la composition précédemment. Au bout de 20 heures de séjour à l'étuve, la culture est récoltée et placée dans des tubes à centrifugation, additionnée des deux tiers de son volume d'eau physiologique. Cette émulsion épaisse est laissée au repos de 24 à 48 heures (au maximum) à 37°5, puis décantée. Le liquide obtenu est dilué dans 5 fois son volume d'eau physiologique, puis filtré sur bougie Berkefeld. CONRADI évapore ensuite ce filtrat à 35° dans le vide jusqu'à réduction au 1/50^e de son volume. L'auteur signale qu'une autolyse de plus

de 48 heures lui a toujours fourni un filtrat moins toxique que celui qu'il obtient avec la technique sus-indiquée. L'addition de chloroforme pour tuer les bacilles avant autolyse ne lui paraît pas avantageuse non plus. NEISSER et SHIGA confirment cette découverte et disent obtenir un produit toxique en émulsionnant une culture sur gélose dans 10 cc. d'eau physiologique, chauffée à 60° pendant une heure, en laissant cette émulsion 48 heures à 37° et en la filtrant sur bougie Reichel.

La même année (1903), VAILLARD et DOPTER obtiennent par décantation un liquide toxique en émulsionnant dans l'eau des cultures sur gélose tuées par le chloroforme ou le chauffage à 58°, et en les soumettant à l'autolyse à 37° durant 20, 30 ou 40 jours.

En 1905, LUDKE, congelant des bacilles de Shiga au moyen d'air liquide, les triture dans un mortier, les émulsionne dans l'eau physiologique et filtre sur bougie cette émulsion (Procédé de MACFADYEN et ROWLAND). Le filtrat est très toxique pour le lapin.

Mais en 1906, KRAUS et DOERR déclarent : « Une autolyse n'est pas nécessaire pour obtenir la toxine du corps des bactéries », s'appuyant sur ce fait qu'en agitant la récolte d'une culture sur gélose dans l'eau physiologique durant quelques minutes, puis en filtrant sur filtre Reichel, ils obtiennent un liquide toxique. Nous discuterons ce point de vue dans le chapitre relatif à la nature de la toxine dysentérique.

BESREDKA, la même année, émulsionne dans l'eau physiologique une culture sur gélose de 18 heures. Cette émulsion est chauffée à 60° durant une heure, puis desséchée dans le vide. 0 gr. 4 de corps de microbes sont alors triturés avec 0 gr. 15 de Cl Na, puis on ajoute 20 cc. d'eau. Le tout est ensuite centrifugé : le liquide limpide est doué de toxicité. FLEXNER et SWEET emploient le procédé de NEISSER et SHIGA. KOLLE, HELLER et DE MESTRAL décrivent sous le nom « d'eau de lavage » un liquide toxique obtenu par le procédé de KRAUS et DOERR. C'est également ce que PANÉ et LOTTI dénomment « agressine ». SELTER, en 1910, a essayé les différentes techniques ci-dessus et déclare qu'il a obtenu les meilleurs résultats en chauffant à 60° durant deux heures une émulsion d'une culture sur gélose qu'il filtre après ce chauffage. C'est ce qu'il nomme « extrait 60° ». OLITSKY et KLIGLER utilisent le procédé de NEISSER et SHIGA.

HIRSZFELD dose sur le lapin des « extraits » obtenus de façons diverses :

1°) Extraits non chauffés : filtrés, dose mortelle, 0,1 ; centrifugés, dose mortelle, 0,05.

2°) Extraits chauffés, filtrés, dose mortelle, 0,5.

Le liquide obtenu en centrifugeant une émulsion de bacilles non chauffés serait donc le plus toxique, mais HIRSZFELD ne dit pas s'il est rigoureusement privé de bacilles.

NEUFELD, à la Société des Nations, mentionne les bons résultats qu'il a obtenus par l'autolyse et le la-

vage, soit en eau physiologique, soit en eau distillée. Enfin, Shiga, dans son deuxième rapport à la Société des Nations, compare les différents procédés. Pour cela, il prépare deux émulsions de cultures de 24 heures sur gélose, l'une en eau physiologique et l'autre en eau distillée, à raison de 2 mgr. de bacilles pour 1 cc. d'eau.

Chaque émulsion est divisée en deux lots :

Il chauffe l'un à 60° durant une heure ; il additionne l'autre de chloroforme pour tuer les germes.

Les quatre espèces de suspensions sont laissées à la température du laboratoire durant 5 jours, puis centrifugées. Les liquides obtenus sont encore filtrés sur bougies Berkefeld avant d'être inoculés au lapin.

Les résultats sont les suivants :

1°) Filtrat de suspension saline chloroformée, dose mortelle	0,05
2°) Filtrat de suspension en eau distillée chloroformée, dose mortelle	0,05
3°) Filtrat de suspension saline chauffée, dose mortelle	0,2
4°) Filtrat de suspension en eau distillée chauffée, dose mortelle	0,2

De plus, SHIGA compare le « produit de lavage » des bactéries vivantes (procédé de KRAUS et DOERR) au « produit d'autolyse » de 7 jours (Procédé de CONRADI, NEISSER et SHIGA). Le premier ne tue pas à la dose de 0 cc.1 intraveineuse, le second tue à la dose de 0,025.

Devons-nous conclure avec Shiga qu'il faut tuer les germes par le chloroforme et préférer la lente autolyse au lavage rapide? Les avis nous semblent trop partagés pour cela et il nous semble qu'un facteur primordial a été trop négligé. En effet, nous avons, en lisant toute la bibliographie, été frappés par ce fait que les auteurs qui ont recherché le meilleur milieu de culture pour l'obtention d'un filtrat de bouillon toxique ont tous observé, CONRADI excepté, le silence le plus complet sur le rôle du milieu nutritif lorsqu'il s'est agi des cultures sur gélose, qu'elles soient employées en totalité ou pour autolyse.

Le rôle du milieu de culture doit pourtant être aussi grand ici que là. Nous en donnerons la preuve par une seule expérience. Sa netteté toute mathématique suffira, au moins, à justifier de nouvelles recherches à ce sujet.

Nous avons fait trois bouillons :

- 1°) Un bouillon Martin ;
- 2°) Une décoction de viande de veau avec 1 % de peptone Chapoteaut ;
- 3° Une décoction de viande de veau avec 2,5 % de peptone Chapoteaut, 0,5 % de phosphate monopotassique et 0,2 % de citrate de soude.

Ces trois milieux furent alcalinisés, chauffés à 120°, puis ajustés au PH uniforme de 8,8. Chacun d'eux fut ensuite additionné de 3 % de gélose, porté à l'ébullition pour dissoudre celle-ci, réparti en boîtes de Roux et stérilisé à 110° durant 30 minutes.

La surface de ces trois milieux futensemencée d'une façon identique. Les trois cultures de 24 heures furent émulsionnées dans trois ballons contenant chacun autant d'eau distillée qu'il y avait eu de bouillon gélosé à être utilisé (ceci afin de comparer le rendement « commercial », si l'on peut dire, d'une quantité donnée de bouillon liquide et sa transformation en gélose nutritive).

Les trois émulsions, additionnées de chloroforme, furent laissées à 30° durant 2 jours, puis filtrées sur bougies Chamberland F.

Voici les résultats des inoculations :

Gélose au bouillon Martin, dose mortelle par kgr : 0,25.

Gélose décoction de veau peptonée à 10 0/00, dose mortelle par kgr : 0,04.

Gélose décoction de veau pept. à 25 0/00 + phosphate : 0,025.

Le temps de culture a aussi une influence : Une culture de 48 heures sur la gélose à la décoction de veau peptonée à 25 0/00 et additionnée de phosphate a tué à la dose de : 0,01.

L'alcalinité doit également entrer en ligne de compte : Un bouillon analogue ajusté au PH 7,5 avant addition de gélose donne une culture de 24 h. qui, autolysée, ne tue pas à la dose de : 0 cc. 05.

(Voir protocole n° VI)

CONCLUSIONS

Nous venons de voir la raison pour laquelle nous avons voulu, contrairement à l'ordre chronologique, étudier d'abord les cultures en milieu liquide. Nos dernières expériences s'inspirent en effet, fort heureusement, des résultats acquis par l'étude du bouillon. La culture sur gélose étant essentiellement aérobie et donnant une récolte plus abondante et plus toxique dans un délai plus court que la culture en bouillon, il est évident que les bacilles devront être récoltés au bout de peu de jours. Le temps exact reste à déterminer, ainsi que le temps et le procédé d'autolyse. Il est toutefois démontré qu'à l'aide de cultures sur milieu solide, nous pouvons obtenir des produits aussi toxiques que les filtrats de culture en milieu liquide, en un temps bien plus court.

CHAPITRE V

De la Pluralité ou de l'Unicité des Produits toxiques du Bacille dysentérique Shiga

Nous abordons ici une question qui a déjà suscité de nombreux travaux et surtout de très nombreuses discussions. Il ne nous semble pas, pourtant, que cette question en ait reçu un complet éclaircissement. Pour la trancher, il faudrait encore beaucoup d'expériences. N'ayant pu le faire, nous avons hésité à aborder ce sujet. Cependant, comme il nous sera possible de tirer du débat une conclusion pratique, nous nous sommes décidé à examiner ce passionnant problème, encouragés par ce fait que notre conclusion se trouve contrôlée par les faits que nous aurons occasion de voir dans les chapitres suivants.

C'est à partir de 1903, depuis les travaux de CONRADI, NEISSER et SHIGA, VAILLARD et DOPTER et ROSENTHAL, qu'il est fait mention du problème qui nous occupe ; mais pour la clarté de son exposé,

nous violerons encore une fois l'ordre chronologique des travaux pour exposer d'abord ceux de trois auteurs américains : OLITSKY, KLIGLER et Mc. CARTNEY, qui, en 1920 et 1923, eurent au moins le mérite d'exposer et de soutenir nettement une des solutions.

Partant de là, nous examinerons tous les travaux antérieurs ou postérieurs dont les conclusions s'accordent ou ne s'accordent pas avec les théories de ces auteurs.

En 1920, Olitsky et Kligler écrivent : « Notre travail sur les toxines produites par le bacille de Shiga nous a amené à penser que ce microorganisme, *in vitro*, produisait deux poisons : une endotoxine et une exotoxine pouvant être séparées et agissant sur les lapins par deux sortes de lésions ». Pour eux, l'exotoxine donnerait régulièrement des lésions du système nerveux chez les lapins, sans donner de lésions intestinales. Ils se gardent toutefois de décrire exactement ce qu'ils entendent par « exotoxine ». L'endotoxine, au contraire, serait enterotrope. Ils obtiennent la première en filtrant des cultures en bouillon additionné de 1/3 de son volume d'une solution d'albumine d'œuf à 1 %, de PH 7, 6, 7, 8 et largement aérées, âgées de 5 jours au maximum. L'endotoxine (obtenue pour OLITSKY et KLIGLER : « par la libération du contenu par autolyse ou dissolution des cellules bactériennes) se rencontrerait dans les vieilles cultures en bouillon ou dans les produits d'une autolyse de

48 heures d'une culture sur gélose de 24 heures. Elle serait séparée de l'exotoxine grâce à deux artifices : 1°) le chauffage à 75° durant une heure qui détruirait l'exotoxine, alors que l'endotoxine ne serait touchée qu'au bout d'une heure de chauffage à 85, 90°.

2°) la neutralisation de l'exotoxine par un sérum monovalent obtenu en immunisant un animal à l'aide de filtrats de cultures jeunes en bouillon albumineux. Ce sérum laisserait intacte l'endotoxine enterotrope.

OLITSKY et KLIGLER notent également que l'exotoxine est précipitable et qu'elle obéit à la loi des multiples lorsqu'on la neutralise par un sérum spécifique.

Un sérum obtenu par immunisation à l'aide de bacilles neutraliserait à la fois l'exo et l'endotoxine.

En 1923, MC CARTNEY et OLITSKY, déduisant des travaux ci-dessus, dont ils donnent confirmation, qu'une bonne oxygénation est nécessaire à l'obtention d'une exotoxine, prétendent arriver à obtenir une endotoxine pure par culture de bacille de Shiga en anaérobiose.

Le filtrat d'une culture de 24 heures se montra atoxique. Les corps microbiens, centrifugés, lavés et émulsionnés donnèrent des lésions intestinales et pas de lésions nerveuses.

En résumé, OLITSKY, KLIGLER et MC CARTNEY soutiennent que le bacille de Shiga : 1° secrète durant sa vie un produit toxique neurotrope ; 2° a dans

ses constituants une substance toxique enterotrope qui n'est rendue libre que par la mort et la lyse de la cellule bactérienne. Recherchons d'abord dans les travaux antérieurs ou postérieurs à cette publication les faits tendant à appuyer l'opinion des auteurs américains.

KRAUS et DOERR, en 1906, écrivent : « A côté de la toxine soluble, un second virus, endocellulaire, appartient probablement aussi au bacille de Shiga, virus qui est contenu dans le corps des bactéries ». Cette opinion est basée sur le fait que les cultures totales sont plus toxiques que les filtrats de culture en bouillon ou les produits d'autolyse privés de germes. DOERR, l'année suivante, publie des essais qui ont dû servir de point de départ à OLITSKY et KLIGLER. Il constate en effet que par un chauffage au-dessus de 70°, la toxine est affaiblie et ne donne plus que des accidents intestinaux, et il émet l'hypothèse qu'il existe un élément neurotoxique sensible à l'action de la chaleur et un élément enterotoxique relativement peu sensible.

PFEIFFER, en 1908, distingue la toxine-lapin « parretische Gift » et la toxine-cobaye « Marantische Gift ».

Heller, en 1909, immunise trois chevaux :

Le premier à l'aide de cultures sur gélose tuées ;

Le second à l'aide de filtrat de culture en bouillon de 20 jours ;

Le troisième à l'aide du produit de lavage de cultures sur gélose très fraîches.

Il constate par la suite que les sérums des deuxième et troisième chevaux neutralisent parfaitement le filtrat de bouillon et l'« eau de lavage », mais qu'il faut 10 fois plus de ces deux sérums pour neutraliser la même dose de culture tuée ou de son extrait.

Inversement, HELLER aurait obtenu du premier cheval un sérum actif pour toutes les toxines, mais moins actif vis-à-vis des « toxines-bouillons » ou « eau de lavage » que les deux autres sérums.

Cet auteur écrit : « La production de la vraie toxine se fait à l'intérieur des cellules et le poison terminé est ensuite excrété. C'est pourquoi on ne peut enlever par lavage toute la toxine », et plus loin : « Nous avons donc à compter avec deux poisons différents : une véritable toxine dont l'existence peut être prouvée en dehors des cellules bactériennes et une endotoxine. Ce n'est pas seulement l'action neutralisante des divers sérums sur chaque préparation toxique de l'agent dysentérique qui nous conduit à cette théorie, mais aussi l'action du poison dans le corps de l'animal... par injection de l'endotoxine à la souris on voit surtout des phénomènes intestinaux.

KOLLE, en 1909, écrit : « Il y a deux poisons différents, la toxine soluble, séparable, qui est neutralisée suivant la loi des multiples, et l'endotoxine, moins bien neutralisée. L'exotoxine est un corps simple ; l'endotoxine, la somme des différentes substances protoplasmiques toxiques ».

SELTHER, en 1910, tout en déclarant l'exotoxine une vue de l'esprit, pense que la toxine qui agit sur le lapin est différente de celle qui agit sur le cobaye à cause des symptômes différents et parce que la toxine tuant le cobaye résiste à des températures plus élevées.

THOMSON, essayant des vaccins en 1916, signale que chez le lapin les réactions du système nerveux furent plus marquées avec le vaccin sensibilisé alors que le vaccin non sensibilisé donne des symptômes intestinaux plus sévères. Il faut noter que le sérum qui lui servit à sensibiliser ses germes est un sérum agglutinant, donc préparé à l'aide de corps microbiens.

TIJTTA et FALSEN SUNDT trouvent que le filtrat d'une culture en bouillon de huit jours ne donne que l'exotoxine et qu'un autolysat de 48 h. d'une culture de 24 h. sur gélose, chauffée à 60°, ne donne que de l'endotoxine. Ce résultat ne manqué pas de nous surprendre d'ailleurs, car OLITSKY et KLIGLER eux-mêmes ont admis l'existence des deux produits dans ce genre d'autolysat.

La même année, KARASAWA, répétant les travaux de DOPTER sur les lésions du système nerveux, constate que la toxine neutralisée par le sérum ne donne plus ces lésions.

KANAI, en 1921, parle de toxine-cobaye et de toxine-lapin.

Enfin, tout récemment, PERRY et COPPINGER, voulant confirmer les travaux de Mc CARTNEY et OLITS-

ky, constatent bien que les cultures aérobies en couche mince donnent, au bout de trois jours un filtrat très toxique, particulièrement pour le système nerveux, alors que des cultures anaérobies ne donnent que de vagues symptômes intestinaux.

Mais ces auteurs anglais, se basant sur les travaux des américains, arrivent à immuniser des animaux contre l'« exotoxine » au moyen de l'endotoxine, ce qui est alors un démenti formel à la théorie sur laquelle ils s'appuient.

Et ceci nous amène à prendre l'étude des travaux infirmant la théorie des Américains OLITSKY, KLIGLER et Mc CARTNEY.

VAILLARD et DOPTER, en 1903, ne croyaient pas à l'existence d'une toxine soluble parce que leur filtrat de culture en bouillon de 5 jours était atoxique. Ils constataient que le chauffage à 75° n'affaiblit pas leur toxine alors que 80° l'affaiblit notablement et qu'elle est détruite à 81°. Mais ces auteurs ne remarquent pas de changement dans les symptômes qui sont toujours nerveux et intestinaux. NEISSER et SHIGA, en 1903, constatent que le chauffage à 75° affaiblit fortement la toxine et réussissent à précipiter celle-ci par l'alcool-éther. BESREDKA, en 1906, dit que la toxine dysentérique est une endotoxine et constate que la température de 78° la détruit au bout d'une heure.

La même année, VAILLARD et DOPTER expriment l'opinion que la toxicité du bouillon est due à l'endotoxine autolysée dans le milieu.

KLEIN, en 1907, croit à l'identité de l'endotoxine et de la toxine parce que son sérum, obtenu en injectant les deux toxines (corps microbiens et bouillon) neutralise les deux sortes de toxines. (Cela ne nous paraît rien moins que démonstratif).

PFEIFFER et UNGERMANN, en 1909, montrent que c'est toujours la toxine totale (corps microbiens) qui est la plus forte alors que le filtrat d'une culture en bouillon n'est actif qu'après autolyse de nombreux bacilles. Ils rejettent donc l'hypothèse d'une sécrétion.

PFEIFFER, répétant seul cette théorie, écrit : « Les poisons dissous qui se trouvent dans les vieilles cultures en bouillon sont des substances toxiques transformées autolytiquement en grande partie et provenant de cellules bactériennes ; ils sont de nature artificielle et sans doute sans signification pour la marche naturelle de la maladie ».

En 1910, SELTER, employant comme matériel toxique des cultures tuées par chauffage à 60° durant 2 heures, constate que la toxicité est à peine touchée à 70°, l'est peu à 80° et après une ébullition de 10 minutes il arrive à tuer l'animal, par injection de la valeur de deux tubes de gélose il est vrai. Il constate que son « extrait à 60° » (voir chapitre des toxines autolysées) est plus toxique que les bacilles restants, que les bacilles vivants sont un peu mieux supportés que les bacilles tués à 60°, que l'extrait est précipitable par l'alcool ou le sulfate d'ammoniaque et qu'il est vite rendu atoxique par l'ébullition. Il

croit à une endotoxine et pense l'exotoxine une conception artificielle. Toutefois il constate qu'un sérum antitoxique ne neutralise pas complètement les corps bactériens ; il attribue ce phénomène à une fixation de l'antitoxine sur des composants bactériens autres que les corps toxiques. D'autre part, nous avons vu plus haut que cet auteur croyait à une toxine-lapin et à une toxine-cobaye.

ELLINGER et ADLER étudiant « l'influence de la toxine dysentérique sur la circulation » constatent que les centres vaso-moteurs sont les premiers atteints et que les vaisseaux dilatés ne réagissent pas plus à l'adrénaline que les centres à la strychnine. Ils remarquent que cette paralysie des muscles vasculaires débute par les vaisseaux internes alors que ceux de la peau ne sont pas dilatés. En lisant ce travail on ne peut s'empêcher de remarquer que les lésions histologiques de l'intoxication dysentérique sont marquées au tout premier plan par une énorme dilatation vasculaire que ce soit dans la paroi du cæcum ou dans la moelle lombaire. L'hypothèse d'une seule et même origine vasomotrice de ces deux sortes d'accidents vient tout naturellement à l'esprit. C'est pourquoi nous avons cru devoir classer ce travail dans les théories unicistes.

Nous arrivons aux rapports et discussions du Comité d'Hygiène de la S. D. N. de 1922. La publication d'OLITSKY et KLIGLER y fit grand bruit.

HIRSZFELD, essayant de reproduire les expériences américaines avec, il est vrai, un milieu différent,

conclut : « Les essais relatifs à la séparation des toxines et des endotoxines au moyen du chauffage à 75° n'ont donné en aucun cas des résultats bien nets. Avec les souches 10 et 100, les extraits chauffés ont produit plus de symptômes intestinaux que de symptômes nerveux. Tandis qu'avec la souche 2, c'est le contraire..... Les essais montrent que les jeunes aussi bien que les vieux poisons de bouillon renferment à l'état de solution les deux éléments dangereux pour les lapins ». Nous pensons toutefois que les expériences de cet auteur polonais ont dû être faites avec des doses trop faibles, car sur 121 lapins en expérience, nous ne relevons que 14 décès.

DOERR, tout en rappelant que ce sont ses propres travaux de 1907 qui servirent de base à OLITSKY et KLIGLER, écrit : « Il résulte de ce qu'un filtrat qui ne produit pas d'effets toxiques sur les lapins n'en produit pas sur les souris et vice-versa, de ce que le degré de concentration de ces filtrats exerce une action d'un parallélisme remarquable chez les deux espèces d'animaux et de l'identité des symptômes d'intoxication sur les deux espèces (paralysie symétrique des extrémités, surtout des extrémités postérieures, diarrhée avec hémorragies) que c'est un poison *simple* ». Ceci ne nous paraît pas démonstratif car HELLER a trouvé pour la souris la différenciation en toxine neurotrope altérable par la chaleur et toxine enterotrope inaltérable par la chaleur que DOERR avait constatée pour le lapin. La sous-commission du sérum antidysentérique concluait : « Il n'y a pas

lieu, dans les expériences à poursuivre, de distinguer le pouvoir antineurotoxique et le pouvoir enterotoxique du sérum. » En même temps, DOP-TER, J. DUMAS et COMBIESCO, répétant avec le bouillon albumine d'œuf les expériences d'OLITSKY et KLIGLER, trouvent que si le filtrat d'une culture de cinq jours donne bien des symptômes nerveux intenses et pas de symptômes intestinaux, l'autopsie révèle toujours un œdème de cæcum. Ils constatent qu'un bouillon de vieille culture (22 jours) privé de ses germes et chauffé une heure à 80°, détermine encore, quoique à forte dose, des paralysies sans symptômes intestinaux, l'autopsie montrant cependant un œdème de cæcum. Les mêmes auteurs notent que les corps de microbes vivants ou morts donnent les deux symptômes ; mais nous devons faire remarquer ici que cela n'infirme par les dires d'OLITSKY et de ses collègues qui ont écrit que ces formes de toxines contenaient toujours les deux poisons.

ZANGGER, en 1923, s'appuyant, à l'inverse de DOERR, sur le fait que la même toxine donne des symptômes différents suivant les divers animaux et, avec DOERR cette fois, sur ce qu'une toxine inactive pour une espèce sensible est inactive pour les autres espèces, conclut que la toxine dysentérique paraît être un corps unique.

HIRSFELD, en 1924, donne comme contraire aux théories d'OLITSKY et KLIGLER le fait que l'immunisation à l'aide de cultures vivantes ou de filtrats de

cultures jeunes donne des sérums neutralisant les deux soi-disant toxines. Nous avons déjà vu que, en ce qui concerne le premier mode d'immunisation, ce résultat n'a rien de surprenant.

KOLLE, SCHLOSSBERGER et R. PRIGGE soutiennent le même point de vue pour les mêmes raisons, ajoutant que quels que soient le sérum et la toxine on obtient des chiffres de rapports constants dans les titrages.

Enfin SMUGA, cherchant à vérifier les séparations en exp et endotoxines, obtient les résultats suivants : « Le filtrat de culture en bouillon n'est pas altéré dans sa toxicité quand on le soumet à un chauffage d'une heure à 70°, mais quand il est porté au-dessus, les lapins injectés avec lui ne présentent aucun symptôme.

La toxine autolysée n'est pas modifiée jusqu'à 70° mais elle perd sa toxicité entièrement lorsqu'elle est soumise à de plus hautes températures.

Une toxine obtenue en émulsionnant dans une solution saline des cultures sur gélose âgées de 18 heures, à la proportion de 2 mgr. par cc., en chauffant cette émulsion aux températures indiquées puis en la filtrant, n'est pas altérée à 70° mais est détruite lorsque l'émulsion a été portée à 80°.

Toutefois un lapin de chaque groupe ayant reçu des toxines chauffées à 80 et 90° est mort avec des symptômes typiques.

CONCLUSIONS

De toutes les publications trop souvent contradictoires quelquefois basées sur des expériences trop peu nombreuses faites avec des milieux et des souches trop différents, il semble cependant que l'hypothèse de la *sécrétion* d'un produit toxique doive être écartée. Le bacille de Shiga est-il comparable à un végétal dont la sève, capable de passer dans un liquide ambiant pas simple osmose, serait l'exotoxine et la charpente cellulosique l'endotoxine? Cela ne semble pas démontré par les travaux connus à ce jour. En effet dans un liquide contenant des microbes il n'y a jamais autolyse complète et les corps bactériens restent toujours visibles et colorables. Cette endotoxine ne serait donc pas liquide. Elle n'est d'ailleurs pas plus décelable dans les corps microbiens eux-mêmes qui, injectés aux animaux, n'ont jamais produit d'effets particuliers.

Nous devons plutôt penser que le produit toxique est une sorte de diastase contenue à l'intérieur de la cellule et passant dans le liquide ambiant par osmose. Cela veut-il dire que nous rejetons tous les faits expérimentaux montrant deux actions différentes de ce produit? Nous nous gardons bien de le dire. Le produit toxique doit être un corps chimique fort complexe et nous concevons aisément que des facteurs chimiques (composition du milieu, degré d'oxygénation, etc...) ou physiques (chaleur) puis-

sent en modifier la formule et, par suite, l'action. Ne voyons-nous pas les chimistes transformer des produits chimiques complexes, supprimer les effets toxiques d'un corps pour ne garder que l'action curative, ou modifier sa formule de telle sorte que l'ingestion ou l'injection en devienne praticable. Et la découverte des anatoxines par RAMON ne vient-elle pas confirmer cette façon de voir?

CHAPITRE VI

Vaccination

A. DES VACCINS A TOXICITÉ NON MODIFIÉE

Il ne pouvait évidemment être question de vacciner l'homme au moyen de bacilles de Shiga vivants. Trois moyens se présentaient donc aux expérimentateurs pour stériliser leurs vaccins. La chaleur, les antiseptiques; la filtration. Nous allons les étudier dans cet ordre :

a) *De la vaccination à l'aide de bacilles tués par la chaleur.*

SHIGA, dès qu'il eut trouvé le bacille qui porte son nom, tenta la vaccination. Il émulsionne une culture sur gélose de 24 heures dans 10 cc. de bouillon et chauffe l'émulsion au bain-marie durant 20 minutes à 60°. Il se fait injecter sous la peau du dos 0 cc, 8 de l'émulsion. Le soir, il est légèrement indisposé, il a une légère douleur locale et sa tête est

lourde. Dans la nuit il a un frisson, sa température atteint 38,6, puis vient une courbature générale et la sensibilité locale augmente. On constate d'ailleurs le lendemain un gonflement léger au point injecté. Les ganglions correspondants sont gonflés et sensibles à la pression. Puis la fièvre baisse et les symptômes s'amendent jusqu'au 5^e jour où la céphalée augmente ; le point d'injection redevient douloureux, la fièvre reparaît. Le 6^e jour la température est de 38°7, le 7^e de 38°9. Le 9^e jour, gonflement local très marqué avec fluctuation. Une incision donne issue, à travers un derme infiltré et dur, à un peu de pus sanglant qui se montre stérile. Le lendemain les symptômes avaient disparu, sauf l'infiltration. En même temps Shiga avait vacciné un cobaye par voie sous-cutanée. Ces deux essais ne furent sanctionnés que par la mise en évidence d'agglutinines spécifiques dans le sérum.

KRUSE, trois ans plus tard, répète la même expérience sur un de ses collaborateurs et sur lui-même.

Les symptômes éprouvés sont les mêmes, marqués le premier jour, puis s'atténuant jusqu'au quatrième jour où il y a aggravation. Toutefois l'incision n'est pas nécessaire.

ROSENTHAL publie, en 1905, un essai de vaccination pratiqué sur lui-même. L'injection sous-cutanée de 1 cc. d'une culture de 24 h. en bouillon chauffée à 55° durant une heure, cause de la fièvre, de la céphalée et des douleurs articulaires le premier et le second jours, ainsi qu'une infiltration lo-

cale douloureuse. Les phénomènes généraux disparaissent le troisième jour et la lésion locale le huitième jour.

DOPTER tente, en 1907, des expériences de vaccination sur les animaux de laboratoire. Les résultats furent mauvais avec le lapin, animal trop sensible.

Un lot de souris de 20 gr. reçoit 0 gr. 00001 de bacilles tués à 60° puis desséchés dans le vide. 2 souris meurent en quatre jours. 15 jours après, DOPTER inocule sous la peau une dose sûrement mortelle de bacilles vivants (1/80 de culture sur gélose de 24 h.) aux survivantes. 50 % des souris résistent. L'immunité obtenue 12 jours après la vaccination dure de 4 à 6 semaines. L'animal, en cours d'immunisation est plus sensible que le témoin (période négative).

CASTELLANI, ayant remarqué que les cultures en eau peptonée donnaient peu de réaction et les croyant cependant aussi aptes à conférer l'immunité, vaccine des hommes avec ces cultures âgées de trois jours, après les avoir stérilisées par chauffage d'une heure à 60°. Son vaccin, polyvalent, n'a pas ou presque pas donné de symptômes locaux ou généraux. L'épreuve d'immunité n'a pas été faite. Seules des agglutinines passagères ont été rencontrées dans le sérum des individus vaccinés.

Thomson, en 1916, vaccine des lapins avec des émulsions de bacilles chauffés à 56° durant une heure. Il injecte une première dose de 200.000.000 de bacilles, un deuxième de 400 millions 10 jours après, et enfin, après le même intervalle, une troi-

sième de 800 millions. Sur 20 lapins, 5 meurent après la première injection, 1 meurt après la deuxième, et un autre après la dernière. Six des survivants reçoivent, quinze jours après, 5 doses mortelles de bacilles vivants dans la veine de l'oreille. Les sept autres reçoivent l'injection d'épreuve 19 jours après la dernière dose de vaccin. Tous résistent, sauf un qui meurt un mois plus tard. THOMSON répète l'expérience avec des doses initiales moins fortes et réduit, de ce fait, la mortalité due à la vaccination.

En 1918, OLITSKY prépare un vaccin polyvalent où il y a moitié de bacilles de Shiga, un quart de bacilles de Flexner et un quart de bacilles de Hiss. Il tue les bacilles par chauffage à 60° durant 30 minutes. Avec ces bacilles il expérimente des émulsions dans les liquides suivants :

1°) Solution saline isotonique + 0,35 % de tricresol : gros œdème, 2 lapins meurent, le troisième est vacciné.

2°) Solution d'Henderson : phosphate monosodique à 1 %, 1 partie ; phosphate disodique à 1 %, 9 parties, pas de réaction locale, 2 lapins meurent, le 3° n'est pas vacciné.

3°) Eau de chaux : pas de vaccination.

4°) Huile de Le Moignic et Pinoy : pas de réaction locale, les lapins résistent ensuite à 10 doses mortelles.

5°) Huile d'olive et lanoline : abcès local. Vaccination contre 10 doses mortelles (l'abcès local pour-

rait être dû à l'huile stérilisée, d'après ARCHARD et FOIX).

6°) Huile d'amandes et lanoline : zones indurées, vaccination contre 10 doses mortelles.

7°) Huile d'amande : pas de réaction. Immunisation contre 10 doses mortelles.

OLITSKY complète ce travail par une expérience fort intéressante : il inocule deux lapins sous la peau; l'un avec une émulsion en eau physiologique, l'autre avec une suspension huileuse. 24 heures après, la sérosité locale du premier lapin ne présente plus un seul bacille. Chez le second lapin, au contraire, ceux-ci ne disparaissent que le troisième jour.

PETRUSCHKY, en 1919, essaie la vaccination de l'homme par la voie cutanée en frottant la peau normale tous les deux jours avec deux ou six gouttes d'un vaccin chauffé une heure à 59°. Il ne constate aucune réaction et aurait ainsi obtenu de meilleurs résultats préventifs qu'en employant la voie sous-cutanée.

CHIBA, étudiant systématiquement, en 1922, l'action de la chaleur, constate qu'il faut chauffer au moins durant 2 heures à 55° pour tuer la bacille de Shiga alors qu'à 60° une heure de chauffage suffit. Mais il remarque aussi que le pouvoir antigène est altéré par une température plus élevée ou un chauffage plus long. Ayant montré que la chaleur sèche agit moins vite que la chaleur humide et considérant que l'action rapide d'une température élevée est plus nuisible au pouvoir antigène que l'action lente

d'une température plus basse, il préconise un vaccin fait avec des bactéries tuées à 55° dans une étuve à air sec. L'immunité ainsi conférée à des lapins serait très supérieure à la vaccination par bacilles tués au bain-marie et la réaction du vaccin serait moins forte. La même année, NICOLLE et CONSEIL publient des essais de vaccination chez l'homme. La voie sous-cutanée ayant présenté de trop gros inconvénients, C. NICOLLE et E. CONSEIL font un essai en empruntant la voie intramusculaire. Ils injectent 250 millions de bacilles chauffés à 72-75° dans la fesse. La réaction générale est insignifiante, la réaction locale marque une incubation de 2 à 4 jours puis apparaît un œdème dur, étendu et douloureux, gênant les mouvements mais qui régresse petit à petit pour disparaître au 10^e jour. Une deuxième injection, d'une dose égale ou supérieure à la première, est pratiquée 8 à 15 jours après ; elle donne une réaction locale constante, souvent plus précoce et sensiblement égale à la première. 1018 soldats furent ainsi vaccinés, mais les opérations de la guerre de 1914-1918 ne permirent pas de vérifier l'immunisation.

Les mêmes auteurs tentent également la voie veineuse, mais une réaction générale trop vive leur interdit bientôt toute nouvelle tentative de ce genre.

BALTEANO, en 1923, expérimente sur des lapins le procédé de PETRUSCHKY. Les lapins, frictionnés sur la peau rasée avec du vaccin chauffé présentent 24 heures après un léger épaissement de la peau

avec exfoliation de l'épiderme. Tout est redevenu normal au 5^e jour. Les lapins sont éprouvés 15 jours après une deuxième friction de vaccin et résistent à quatre doses mortelles.

Enfin, MARIAN PERRY et COPPINGER vaccinent par voie sous-cutanée des lapins et deux hommes avec des bacilles cultivés en anaérobiose et chauffés à 56° durant 30 minutes. Un des lapins vaccinés résiste à une dose mortelle de culture aérobie.

Nous avons réservé pour la fin de ce paragraphe l'exposé de tous les travaux relatifs aux vaccinations *per os*, ce mode nous apparaissant assez différent de tous les autres pour justifier cette façon de faire.

Ce fut ZEITLIN qui, le premier, dès l'année 1905, tenta la vaccination par voie digestive. Il avale à 3 jours d'intervalle 1 cc. 3, 9, 15, 30 et 50 cc. d'une émulsion à 0 mgr. 2 par cc. d'une culture sur gélose de 24 h. chauffée à 60°.

ZEITLIN n'éprouve aucun symptôme et constate, par la suite, que son sérum, agglutinant déjà le bacille de Shiga, a subi une légère augmentation de ce pouvoir.

En 1907, HIDA et TORODA démontrent la formation d'anticorps chez le cobaye par ingestion de bacilles préalablement digérés par la pepsine et la trypsine, mais disent que les bacilles chauffés à 60° sont incapables de former ces anticorps. SHIGA, en 1908, signale qu'il a réussi à immuniser des lapins contre son bacille par administration *per os* de bacilles chauffés.

La même année, DOPTER reprend ce procédé d'une façon plus expérimentale. Il émulsionne dans du lait des bacilles de Shiga tués préalablement par chauffage d'une heure à 58° et desséchés dans le vide, puis il fait boire le mélange à des souris de 20 gr. DOPTER constate :

1°) Qu'une seule ingestion de 5 mgr. n'est pas suffisante et qu'il est préférable de donner 2, 3 ou 4 repas à raison de 1 par jour. Si la dose de 5 mgr. est dépassée l'animal maigrit et ne résiste pas à l'épreuve mortelle 15 jours après la première ingestion, ou même meurt avant. Les souris qui n'ont eu que 2 à 4 repas résistent ensuite à une dose mortelle (1/80 de culture sur gélose sous la peau).

2°) Que la dose journalière de 5 mgr. est la dose optima (avec 2 mgr. par jour, on n'obtient rien).

3° Qu'une seule dose plus forte (de 1 à 2 centigr.) ne donne rien.

4° Que l'immunité obtenue n'est certaine qu'au bout de 15 jours et n'excède pas 30 jours. Il y a une période négative au début. Avec des bacilles vivants, la dose optima est d'un tube de gélose de 24 heures.

En 1919, BESREDKA constate qu'une seule ingestion de bacilles tués à 60° (récolte de 4 tubes de gélose) donne à des lapins un sérum légèrement agglutinant, alors que deux ingestions à 8 jours d'intervalle ne produisent rien. Le sérum de ces lapins n'acquiert aucune propriété thérapeutique, au moins pour des essais sur la souris. Pourtant, des

lapins ainsi traités résistent par la suite contre une infection dysentérique mortelle provoquée par l'inoculation intraveineuse de 1/10 d'une culture sur gélose. L'auteur ne mentionne pas combien de doses mortelles représente cette inoculation. BESREDKA pense que cette immunité s'établit à la deuxième ingestion grâce à des érosions de la muqueuse dues à la première ingestion. Nous croyons sans peine que cette première ingestion cause des lésions de la muqueuse lorsque nous relevons que ce vaccin (1/6 de boîte de Roux chauffé à 60° durant une heure et délayé dans 40 cc. d'eau physiologique. La dose ingérée est de 6 cc. 5 de cette émulsion additionnée de bile de bœuf et de réglisse. Le second vaccin est fait avec 1/5 de boîte de Roux), a tué 3 lapins sur 6.

En 1922, KANAI fait de nombreuses expériences sur les vaccinations et conclut que si l'absorption *per os* de vaccin peut donner une immunité, la voie sous-cutanée donne de bien meilleurs résultats. Il ajoute que l'addition de bile ne semble pas augmenter l'efficacité de la vaccination *per os* et que le titrage des anticorps montre que ceux-ci sont augmentés par les deux ingestions répétées.

L'année suivante, COMBIESCO A. MAGHERU et CALALB expérimentent deux entéro-vaccins. Ils font ingérer en une seule fois 1/6 de boîte de Roux de bacilles tués par chauffage d'une heure à 60° à 13 lapins. 3 succombent du fait de la vaccination. Les autres ne résistent pas, 12 jours après, à l'injection intraveineuse de 1/10 de la récolte vivante d'un tu-

be de gélose. 8 lapins reçoivent deux repas : 1° 1/6 de boîte de Roux chauffé à 60° ; 2°, 8 jours après, 1/5 de boîte. 4 jours après, 2 lapins meurent ; tous les survivants résistent 14 jours après à l'injection d'épreuve.

COMBIESCO et ses collaborateurs essaient un autre entero-vaccin préparé de la façon suivante : émulsion d'une culture de 24 heures en boîte de Roux, chauffage à 75° durant une heure, puis centrifugation. Le dépôt refroidi à la glace, pesé, additionné de 2 fois son poids de sulfate de soude anhydre et desséché dans le vide est émulsionné dans l'eau physiologique. Les animaux sont soumis à un jeûne avant et après chaque ingestion de vaccin. Six lots de lapins reçoivent 4 fois de suite 1 gr., 0 gr. 50, 0 gr. 25, 0 gr. 15, 0 gr. 10, 0 gr. 05 de vaccin. Quelques-uns succombent. Eprouvés 15 jours après, les lots n'ayant reçu que 0,05 ou 0,01 succombent en trois jours ; les autres résistent. Les auteurs concluent : « La vaccination antidysentérique par voie buccale est possible chez le lapin, mais inconstante. Grandes différences individuelles. Le sérum des animaux vaccinés ne contient pas d'agglutinines ni de précipitines, mais est antitoxique (dosage chez la souris). En 1923, J. DUMAS utilise ce procédé pour enrayer une épidémie de dysenterie à bacille de Shiga qui vient de se déclarer dans l'asile d'aliénés de Moissel. 156 individus avalent chacun trois cachets, soit à peu près la récolte d'une boîte de Roux.

Cette vaccination ne donne lieu à aucun accident.

b) *De la vaccination avec des bacilles de Shiga tués
par un moyen chimique*

CASTELLANI, comparant en 1916 un vaccin stérilisé par la chaleur et un vaccin stérilisé par addition de 0,5 % d'acide phénique, en injections sous-cutanées, marque sa préférence pour ce dernier mode. La même année, THOMSON, faisant la même étude comparative, conclut dans le même sens, son vaccin phéniqué se montrant moins toxique et la chaleur détruisant le pouvoir antigène.

En 1918, WHITMORE, FENNEL et PETERSEN émulsionnent des bacilles desséchés, puis tués par un mélange d'éther et de chloroforme dans un milieu composé de lanoline et d'huile d'amandes douces par parties égales. Ce vaccin est très bien supporté par le lapin et par l'homme qui ne présentent aucune réaction. Les auteurs se contentent de chercher les agglutinines. Pour eux, les avantages des lipovaccins sont :

- 1° Diminution des réactions locales et générales ;
- 2° Possibilité de donner une dose suffisante pour immuniser en une seule injection ;
- 3° Persistance chez l'individu d'un foyer immunisant pendant plusieurs mois, d'où un prolongement de la période d'immunité ;
- 4° Possibilité d'incorporer aux vaccins certains lipoides ayant des effets antitoxiques.
- 5° Empêchement de l'autolyse et de la détérioration du vaccin :

En 1920, Vincent fait un essai de vaccination de l'homme au moyen de bacilles tués par l'éther. Des doses faibles ne provoquent qu'une légère réaction.

c) *De la vaccination par les produits toxiques
séparés des corps bactériens*

DOPTER, en 1909, vaccine des souris avec des produits d'autolyse bactérienne. L'immunité, acquise au bout de 10 à 12 jours, dure 4 à 5 semaines. Il y a une période négative.

B. DES VACCINS A TOXICITÉ RÉDUITE

L'exposé ci-dessus nous montre que le plus grand obstacle à la vaccination antidysentérique est, sans conteste, la toxicité du vaccin lui-même.

La nécessité de réduire le plus possible cette toxicité en altérant le moins possible le pouvoir antigène est apparu dès les premiers essais. Aussi est-ce Shiga qui, ici encore, nous montre le chemin.

Nous diviserons les procédés employés en deux groupes : a) vaccins dits « sensibilisés » au moyen de sérum spécifique ; b) vaccins rendus atoxiques par des moyens chimiques ou physiques. Groupe dans lequel nous rangerons l'« anatoxine » de création toute récente.

a) *Des vaccins atténués au moyen de
sérum spécifique*

En 1901, Shiga vaccine des cobayes contre trois doses mortelles à l'aide de bacilles atténués et mé-

langés à du sérum spécifique. L'immunité obtenue dure trois semaines. Chez l'homme, Shiga injecte une première dose d'une demi anse de culture de 24 heures atténuée et pulvérisée avec 0 cc. 5 de sérum antitoxique puissant, puis, 4 jours après, une dose d'une anse sans sérum. Des « corps protecteurs » (antitoxine ou agglutinine ?) seraient constatables pendant un mois dans le sang des vaccinés. SHIGA vaccine ainsi 10.000 hommes, mais ne peut, pour de multiples raisons, publier de statistique. Il ne semble pas toutefois que la morbidité ait été nettement jugulée.

ROSENTHAL, en 1905, essaie le procédé de Shiga sur un garçon de laboratoire. La première injection (vaccin + sérum) ne donne qu'une légère réaction ($37^{\circ}8$, malaise général et petite infiltration locale) qui disparaît en 24 heures. La deuxième injection (1 cc. de vaccin sans sérum) déclenche la réaction typique des vaccins chauffés. Léger pouvoir agglutinant du sérum 9 jours après.

DOPTER reprend la question expérimentalement en 1907 et 1909. Il injecte à des souris de 20 gr. un mélange fait in vitro de 0 cc. 25 de sérum spécifique et de 0 gr. 0005 de bacilles secs (10 doses mortelles). L'immunité est acquise dès le 1^{er} ou le 2^e jour et dure 20 jours.

Dans un nouvel essai, il injecte d'abord 0 cc. 25 de sérum et 0 gr. 0001 de bacilles tués et desséchés, puis 4 ou 5 jours après, 0,06 de sérum et 0 gr. 0001 de bacilles. Les résultats sont les mêmes que dans le premier essai.

DOPFER préconise sous le nom de vaccination par bacilles sensibilisés une technique nouvelle qui paraît donner de meilleurs résultats et se trouvera maintes fois répétée par la suite. Voici cette technique : 9 Peser 0 gr. 005 de bacilles tués par chauffage d'une heure à 60°, puis desséchés dans le vide. Les émulsionner d'une façon homogène dans quelques gouttes d'eau physiologique stérile. Additionner l'émulsion de sérum antidysentérique non chauffé, très agglutinant, de façon que le volume total soit de 2 cc. Mélanger soigneusement et laisser reposer 12 heures à la température du laboratoire. Les bacilles agglutinés et sensibilisés se sont amassés au fond du tube. Décanter, laver deux fois, puis émulsionner le dépôt de centrifugation dans 2 cc. d'eau physiologique. Cette émulsion constitue le vaccin.

Des souris de 20 gr. reçoivent sous la peau 0 cc. 2 de ce vaccin, soit 0 gr. 0005 de bacilles sensibilisés (10 fois la dose mortelle). DOPFER éprouve ensuite avec une dose sûrement mortelle et constate que :

- 1° L'immunité est acquise en 4 à 5 jours ;
- 2° La période négative n'existe pas ;
- 3° L'immunité dure au minimum 4 mois $\frac{1}{2}$;
- 4° La toxicité du vaccin a complètement disparu.

En 1914, BROUGHTON-ALCOOK publie une technique de vaccination que nous classons ici, quoique

le sérum employé ne soit pas spécifique. L'auteur anglais indique la technique suivante :

« Emulsionner dans l'eau physiologique une culture de 22 à 24 heures sur gélose peptonée, puis centrifuger. Diluer le dépôt dans 2 cc. d'eau physiologique. Chauffer à 56° durant une heure. Compter les bacilles contenus dans 1 cc. Mélanger 2 cc. de cette émulsion dans 20 cc. de sérums humains normaux chauffés et mélangés ou dans 10 cc. de sérum normal de cheval chauffé. Laisser en contact une nuit. Centrifuger et laver deux fois. Le dépôt est émulsionné dans de l'eau salée à 0,9 %, de telle sorte que 1 cc. contienne 350 millions de bacilles. Vacciner de préférence dans la soirée. Faire trois doses de : 1, 2 et 3 cc., chaque dose étant injectée en quatre injections faites en des points différents. L'auteur dit avoir vacciné deux cents individus sans avoir relevé de réaction sensible.

Nous avons cherché en vain les expériences qui nous auraient peut-être appris pourquoi Broughton-Alcook a cru devoir adopter une technique aussi complexe.

JOHNSON et MILNE, en 1916, tout en mentionnant le travail de BROUGHTON-ALCOOK, reprennent la technique plus rationnelle de DOPTER et concluent que : « La sensibilisation complète du vaccin dysentérique produit une réduction marquée dans la réaction locale, et la réaction générale est très exceptionnelle ».

THOMSON, dans l'étude comparative dont nous

avons déjà eu occasion de parler, n'a pas négligé les vaccins sensibilisés, mais il conclut à l'encontre des auteurs précédents : « Les vaccins traités par le sérum se montrèrent plus dangereux que ceux qui ne le furent pas, les symptômes nerveux étant toujours plus sévères ». Il faut toutefois remarquer que le sérum employé était du sérum de lapin immunisé par THOMSON lui-même et que ce sérum, qu'il qualifie de « très agglutinant », était peut-être fort différent des sérums thérapeutiques employés par les autres auteurs.

Le vaccin de DITTHORN et LOEWENTHAL ne mérite pas que nous nous y arrêtions, cette phrase des auteurs allemands : « Etant données les circonstances actuelles (la guerre), nous croyons ne pas devoir communiquer la technique exacte » enlevant tout caractère scientifique à leur travail.

GRAEME GIBSON expérimente, en 1917, un vaccin sensibilisé selon la méthode de Dopter, auquel il ajoute ensuite 1 % d'acide phénique. Un homme reçoit 50.000.000 de bacilles sensibilisés. La réaction, d'abord légère, devint sensible localement au quatrième jour pour ne disparaître qu'au dixième jour. Un deuxième individu reçut la même dose, eut la même réaction, puis reçut, 14 jours après la première, une deuxième dose. La réaction locale fut assez forte. Il n'y eut point de réaction générale.

Chez l'animal, GIBSON essaie d'abord la technique de Shiga. Il donne une première dose de

2 mgr. de bacilles de SHIGA, FLEXNER et HISS, mélangés à parties égales, avec un volume égal le 1 cc. de sérum antidysentérique. Une deuxième dose d'1 cc., comprenant 4 parties de vaccin pour 1 de sérum, est injectée 4 jours après. Il expérimente ensuite une technique nouvelle dans laquelle il utilise pour le mélange vaccin-sérum un sérum dit « absorbé », c'est-à-dire mis préalablement en contact avec des bacilles de Shiga jusqu'à la perte totale de son pouvoir agglutinant. Il récupère d'ailleurs les bacilles ainsi sensibilisés et compare ainsi quatre vaccins :

1° bacilles tués par l'acide phénique : paralysie, diarrhée.

2° bacilles chauffés + sérum spécif. : rien.

3° bacilles chauffés + sérum absorbé : rien.

4° bacilles sensibilisés : paralysie, diarrhée.

A l'épreuve d'immunisation faite deux mois après avec 5 doses mortelles, seul le lapin, ayant reçu le vaccin ordinaire à bacilles phéniqués, résiste.

GIBSON renouvelle l'expérience et constate cette fois que « l'addition de sérum antidysentérique au vaccin neutralise ses effets toxiques. L'enlèvement des substances anti-bactériennes de ce sérum ne nuit pas à son action anti-toxique. De l'enlèvement de ces substances résulte la formation d'agglutinines dans le sang, ce qui ne peut être montré avec le sérum employé en totalité ».

Ce vaccin au sérum « absorbé » est alors essayé chez l'homme et ne provoque qu'une induration

locale durant 8 jours. Un lapin ayant reçu 500 millions de bacilles + 0 cc. 5 de sérum absorbé, puis, 10 jours après, 1000 millions de bacilles tués sans sérum, ne présente pas de réaction. 14 jours après, il est éprouvé avec 4 doses mortelles de bacilles vivants et ne présente qu'un peu de parésie. De plus, son sérum se montre antitoxique.

Relevons, à ce sujet, que c'est la première fois que nous trouvons la vérification d'une vaccination par la recherche du pouvoir antitoxique d'un sérum de l'individu vacciné. Cette méthode est fort intéressante pour vérifier l'immunisation de l'homme et nous aurons l'occasion de la revoir.

En 1918, BOEHNCKE, HAMBURGER et SCHELENZ publient les essais de leur vaccin, le fameux « Dysbacta » qui, dans la bibliographie allemande, souleva bientôt une poussière de communications dans laquelle il est fort difficile de voir clair. Le « Dysbacta » est un mélange de bacilles de SHIGA, de Flexner et de Hiss, tués par un séjour de 30 minutes à 37° dans l'eau phéniquée à 1 %, mélange additionné de toxine et d'antitoxine. Près de 100.000 personnes sont injectées 2 ou 3 fois, à 6 jours d'intervalle. Les injections sont suivies de rougeur locale, de tuméfaction et d'endolorissement du bras. La température a atteint 38° dans 5 % des cas. La présence d'agglutinines dans le sérum est démontrée, mais les auteurs reconnaissent eux-mêmes que cela a peu de valeur. Il manque au « Dysbacta » une base expérimentale solide.

b) DES VACCINS RENDUS ATOXIQUES PAR DES PROCÉDÉS
CHIMIQUES OU PHYSIQUES

Ce sont deux auteurs anglais, RUFFER et WILLMORE qui, en 1908, ont, les premiers, cherché à neutraliser la toxicité des vaccins antidysentériques par un procédé chimique.

Se basant sur le fait que les toxines bactériennes, lorsqu'elles sont digérées artificiellement par de la pepsine et de l'acide chlorhydrique, perdent leur toxicité en quelques heures, ils cherchent avec quelle forme de toxine et au bout de combien de temps de digestion la toxicité est abolie sans que le pouvoir antigène soit altéré.

RUFFER et WILLMORE préfèrent une émulsion de bacilles chauffée une heure à 57° à cause de sa toxicité plus stable. Une dose mortelle de cette émulsion, digérée pendant 12 heures puis alcalinisée, ne produit aucun symptôme.

Ces deux auteurs notent que l'émulsion primitive est précipitable par le sérum spécifique et que l'émulsion digérée, quoique privée de son pouvoir toxique, conserve la propriété d'être clarifiée par le sérum. Ce fait est peut-être à rapprocher des phénomènes que nous aurons à examiner plus tard, au chapitre de la floculation.

Dans le même travail, nous lisons plus loin : « Une dose minima¹ mortelle, rendue sans danger par la digestion, confère néanmoins de nouvelles proprié-

tés au sérum d'un animal auquel on l'injecte. Il devient agglutinant et antitoxique, et l'animal résiste à l'inoculation de 5 à 10 doses mortelles. Les injections répétées ne donnant aucune réaction confèrent une très forte immunité (20 doses mortelles) qui apparaît très rapidement (6 jours) ».

Huit ans plus tard, DEAN et ADAMSON, pour modifier les propriétés toxiques sans atténuer le pouvoir antigène, eurent l'idée d'employer l'Eusol (1) que des auteurs anglais utilisaient alors pour combattre des toxémies ou des septicémies.

Dès les premiers essais, les auteurs se rendent compte que l'Eusol n'est pas bactéricide *in vitro* et sont obligés de tuer préalablement les bacilles par l'action de la chaleur. La préparation du vaccin de DEAN et ADAMSON devient donc la suivante : « Préparer une émulsion de 200 millions de bacilles par C.C., chauffer une heure à 58, 60°. Mélanger avec une quantité égale d'une solution fraîchement préparée d'Eusol à 1/500 dans l'eau physiologique. Laisser 24 heures à la température de la salle. Injecter sous la peau de l'homme une première dose de 1 cc., une deuxième, 10 jours après, de 1 cc. d'une émulsion contenant 200 millions de bacilles par cc. traitée de la même façon et enfin une troisième dose de 200 millions ou plus, stérilisée par la chaleur mais non traitée par l'Eusol ».

(1) L'Eusol est la solution aqueuse du produit obtenu en mélangeant intimement du chlorure de chaux finement broyé et de l'acide borique en poudre.

Les conclusions sont les suivantes : « 1° la toxicité d'une émulsion de bacilles de Shiga peut être énormément réduite ou même complètement détruite par l'action d'une solution diluée d'Eusol ou d'un peroxyde d'hydrogène. 2° L'injection d'une petite quantité de cette émulsion, rendue atoxique, est suivie de la production d'un degré d'immunisation satisfaisant (5 à 10 doses mortelles chez le lapin). En 1918, RANQUE et SENEZ traitent des émulsions de bacilles de SHIGA, par l'iode qui stérilise les bacilles et atténue leur toxicité, et neutralisent ensuite l'iode par l'hyposulfite de soude.

Des animaux sensibles supportent des doses massives de ce vaccin et l'injection sous la peau ne provoque chez l'homme que de faibles réactions locales. Il est regrettable que l'épreuve d'immunité n'ait pu être faite.

En 1919, FROUIN et MOUSSALI publient une note sur « l'action des sels de terres rares sur les bacilles dysentériques » dans laquelle nous lisons que le sulfate de lanthane, légèrement bactéricide, est antitoxique vis-à-vis du bacille de Shiga. En ne tenant pas compte des travaux de DITTHORN et LOEWENTHAL pour la raison énoncée dans le paragraphe précédent, nous arrivons au travail de JÖTTEN. « Sur l'emploi de bacilles dissous par l'antiformine pour l'obtention d'un sérum actif agglutinant ». Nous y voyons qu'une solution à 0,05 % d'antiformine stérilise complètement une culture de bacilles de Shiga en 10 secondes ; qu'une émulsion, tuant, par voie veineuse, au trentième d'anse, le lapin en 24 heu-

res, est rendue atoxique pour cet animal par addition d'un volume égal d'une solution d'antiformine à 4 %. Le mélange est neutralisé par l'acide sulfurique et déchloruré par le sulfite de soude avant injection. Enfin, nous y trouvons un tableau comparatif montrant que c'est l'émulsion qui a subi l'action d'une solution à 2 % durant 30 secondes qui confère au sérum de lapin le plus haut pouvoir agglutinant (1/16.000). Il est regrettable que ce travail n'ait pas été poursuivi relativement au pouvoir antitoxique du sérum et à la possibilité d'extension du procédé à la vaccination.

En 1922, COPPINGER et ROBERTSON, se basant sur les expériences de THOMSON démontrant que si on dissout des bacilles dans de la soude à 10 % ou de l'antiformine on obtient, en neutralisant par un acide, un précipité qui a perdu tout pouvoir toxique mais a gardé ses propriétés antigènes, cherchent à obtenir ce précipité avec une émulsion des bacilles de Shiga. Les deux anglais arrivent à ce but par un moyen qui ne manque pas d'ingéniosité. Ils choisissent l'ammoniaque concentré comme liquide alcalin propre à attaquer les bacilles, puis après 12 heures de séjour du mélange à 37° ils effectuent la neutralisation au moyen d'acide sulfurique à 20 %. Cet acide, se combinant avec l'ammoniaque, donne du sulfate d'ammoniaque et lorsque la neutralisation est faite, ce dernier produit un gros précipité. L'inoculation de ce précipité à des lapins montra que la toxicité était sensiblement réduite, alors que le pouvoir antigène était conservé.

Des doses de 0,5-1 et 5 cc. injectées sous la peau, à 7 jours d'intervalle, immunisent le lapin contre 10 à 20 doses mortelles. Toutefois la dose de 0 cc. 25 du vaccin injecté dans la veine tue le lapin. La toxicité est donc loin d'être totalement abolie.

En 1925, VIOLLE, étudiant l'action du chlorure d'or, constate que l'action d'une solution à 1 % rend, au bout d'une heure de contact, une culture de bacilles de Shiga absolument inoffensive pour le lapin.

P. DURAND, à la même époque, compare trois formes de vaccins antidysentériques :

Des bacilles chauffés 30 minutes à 58° tuent la souris à la dose de 100 millions de bacilles injectés dans le péritoine.

Des bacilles stérilisés par l'éther tuent, à la même dose. Il faut, par contre, 900 millions de bacilles tués par 0,5 % de formol pour obtenir le même résultat.

DURAND vaccine des souris avec les 3 vaccins (il neutralise le formol du troisième au moyen d'ammoniaque étendu (indicateur phénolsulphophtaléine). Les doses nécessaires pour protéger la souris se sont montrées à peu près égales pour les deux premiers, d'un tiers plus fortes pour le vaccin formolé.

L'injection de 1 milliard 1/2 de bacilles de Shiga formolés n'a pas donné de réaction notable chez l'homme.

Mais en 1924, avaient été publiés les remarquables travaux de RAMON sur l'anatoxine diphtérique, dont les résultats si intéressants eurent bien vite

leur répercussion dans le domaine qui nous intéresse.

En France, LESBRE et VERDEAU additionnant un filtrat d'une culture de trois semaines en bouillon Martin de 0,3 % de formol du commerce, puis en le chauffant à 40° durant 20 jours, constatent que cette « anatoxine » est tolérée par des lapins aux doses de 2 cc. injectées sous la peau à trois reprises et à 5 jours d'intervalle. Trois ingestions de 8 cc. ont, par contre, déterminé un amaigrissement marqué et une paralysie transitoire. Cette anatoxine ne paraît pas stable aux deux auteurs car une nouvelle addition de formol ou l'addition de 2 % de lessive de soude augmentent sa toxicité. Ils constatent que la proportion de 0,6 % de formol mise d'emblée donne un produit atoxique stable. Des lapins vaccinés avec cette anatoxine ne présentent aucun trouble et résistent à une dose mortelle. De nouveaux essais ont montré à LESBRE que deux inoculations de son anatoxine, pratiquées à 7 jours d'intervalle, suffisent pour protéger l'animal ; et que, par contre, une seule injection, même supérieure aux deux échelonnées, ne donne qu'une ébauche d'immunisation.

Ses essais d'immunisation par la voie digestive, faits sur le lapin sont démonstratifs à ce sujet.

GLOTOV, à Moscou, utilise un bouillon de PH 8,4 avec peptone Chapoteaut, qu'il filtre sur papier au bout de 21 jours de culture. Il ajoute 4 % de formol et le chauffe à 40° durant 25 à 35 jours. Il a également employé des « anatoxines totales », bouillon non filtré formolé.

Grâce à ces anatoxines il vaccine des souris et des lapins et montre que le sérum de ces derniers a des propriétés antitoxiques. Ayant essayé les diverses voies d'inoculation, Glotov conclut que la vaccination par voie veineuse ou sous-cutanée donne une immunité plus forte que la voie intradermique ou intestinale.

Enfin, l'auteur s'est injecté 0 cc. 5 d'anatoxine et n'observe qu'une légère rougeur et un peu de prurit.

Au Brésil, ARLINDO DE ASSIS, faisant une étude analogue, conclut :

1° Le formol atténue la toxicité pour le lapin des bouillons de culture du bacille de Shiga filtrés sur bougie.

2° Cette atténuation est plus rapide et plus grande à 37° qu'à la glacière.

3° Il a été possible de réduire 100 fois la toxicité d'une toxine de Shiga en bouillon avec 0,25 % de formol et 3 jours à 37°.

4° L'atténuation de la toxine n'a jamais été complète ni avec la concentration élevée de formol (1 %) ni avec le formol et la température de 37°. On ne peut donc la désigner sous le nom d'anatoxine.

5° La toxine dysentérique atténuée par le formol a permis d'obtenir en 20 jours l'immunisation contre l'inoculation expérimentale de bacilles de Shiga vivants et virulents.

Presqu'en même temps J. DUMAS, G. RAMON et S. BILAL adressent à l'Académie des Sciences un mé-

moire donnant les résultats d'une longue série de travaux. Nous y trouvons des faits précis :

Un filtrat de culture en bouillon de 15 jours, tuant par voie veineuse à 0,05 par kgr. est additionné de 0,4 % de formol du commerce et soumis durant 40 jours à la température de 37°, 10 cc. de cette anatoxine, injectés dans la veine du lapin, n'occasionnent aucun trouble.

L'injection sous-cutanée de 0 cc. 5, puis, 8 jours après, de 1 cc. de ce produit, immunise le lapin contre l'inoculation, 16 jours plus tard, de 8 doses mortelles de filtrat de bouillon injectées dans la veine ou de 6 doses mortelles de culture en bouillon de 24 heures sous la peau.

Un exposé très complet de ces travaux doit paraître prochainement dans les annales de l'Institut Pasteur. Nous nous permettons de le résumer ici : Le produit toxique utilisé est un filtrat de culture en bouillon-peptone Chapoteaut alcalinisé, laissée 15 jours à 37°. Ce filtrat est mortel pour le lapin à la dose de 0 cc, 02 par kgr. lorsqu'il est injecté dans la veine.

Ce liquide toxique est additionné d'une solution de formaldéhyde à 40 % ; à raison de 6 cc. par litre, puis placé à l'étuve à 37°. Sous l'action combinée du formol, de la température et du temps, le pouvoir toxique de ce liquide s'atténue. Au bout de 15 jours il est nécessaire d'en injecter 5 cc. dans la veine de l'oreille pour entraîner la mort d'un lapin.

Après un mois, l'animal qui reçoit 10 cc. de cette

anatoxine dysentérique reste légèrement prostré durant 24 heures, perd un peu de son poids, puis reprend rapidement son poids et son allure habituels.

La dose optimum de formol est 6 cc. pour 1 litre. Des quantités inférieures : 2, 3 ou 4 cc. sont insuffisantes puisque la toxine ainsi traitée, au bout d'un mois de séjour à 37°, est mortelle pour le lapin aux doses intraveineuses de 5 à 6 cc.

Si, par contre, des doses plus fortes (7 à 8 cc.) sont ajoutées, le produit obtenu a bien perdu sa toxicité, mais ses propriétés antigènes sont également diminuées. Les auteurs n'ont jamais observé l'instabilité signalée par LESBRE et VERDEAU.

Des lapins reçoivent sous la peau, à 8 jours d'intervalle, 0,5 et 1 cc. de cette anatoxine. Aucune lésion locale ; léger amaigrissement. Deux semaines après, les animaux supportent 4, 6 et même 8 doses mortelles de toxiques dysentérique ou l'injection sous cutanée de 3 à 4 doses mortelles d'une culture de 24 heures en bouillon.

Les propriétés antigènes de l'anatoxine sont altérées par un chauffage de 45 minutes à 65°, se conduisant en cela comme les autres vaccins étudiés préalablement.

Des essais de vaccination humaine ont été pratiquées sur sept volontaires.

Une injection de 0,5 d'anatoxine dysentérique a d'abord été poussée sous la peau de la face externe de la cuisse, déterminant presque instantanément

une très légère douleur qui dure seulement quelques secondes. Tout redevient absolument normal jusqu'au troisième jour où une légère induration apparaît au point d'injection, cette induration est douloureuse à la pression, elle dure de 2 à 6 jours suivant les individus, mais n'occasionne aucune perturbation fonctionnelle. Il n'y a jamais de réaction générale. Il n'y a pas de fièvre, pas d'albuminurie. Huit jours après la première injection, une deuxième de 1 cc. a été pratiquée ; certains sujets ont réagi comme la première fois, d'autres qui n'avaient rien eu ont réagi localement et enfin d'autres n'ont eu aucune réaction. Les sérums des sujets vaccinés, recueillis trois semaines après la vaccination possèdent des propriétés antitoxiques manifestes.

0 cc. 2 de ces sérums neutralisent *in vitro* une, deux, trois et même quatre doses mortelles de toxines.

Les résultats obtenus étant très encourageants, la vaccination à l'aide de l'anatoxine dysentérique de DUMAS, RAMON et BILAL a été essayée sur une plus grande échelle.

31 officiers-élèves du croiseur « Jeanne d'Arc » se sont soumis bénévolement à cette vaccination. Celle-ci étant trop récente, nous ne pouvons qu'en tirer les conclusions au point de vue réaction. Le médecin principal HAMET, arbitre impartial, écrit : « En somme, l'injection d'anatoxine dysentérique n'a déterminé chez les 31 officiers vaccinés que des réactions locales légères et aucune réaction d'or-

dre général, les phénomènes sont incomparablement moins prononcés que ceux déterminés par l'injection de vaccin typhoïdique. L'injection d'anatoxine dysentérique n'a provoqué aucune indisponibilité de service, même partielle. »

Enfin, tout récemment, nous avons eu sous les yeux le travail de KRAUS, AWOKI et KOVACS : « Sur l'immunisation active avec des filtrats atoxiques. » Ces auteurs pensent que dans la formation des poisons il y a un stade d'atoxicité pendant lequel le produit, inachevé comme toxine, serait cependant bon antigène. Ils essaient d'appuyer leur théorie sur ce fait que des doses répétées de 1 à 5 cc. d'une culture en bouillon de deux jours, filtrée sur papier, injectées dans la veine de l'oreille de lapins, les immunisent contre deux à trois doses mortelles de toxine.

Nous pensons que KRAUS et ses collaborateurs n'ont point fait la démonstration de ce qu'ils avancent parce que :

1°) Leur filtrat de culture en bouillon n'est pas *atoxique* il est légèrement *toxique*, puisque avec une dose vaccinant (3 cc.) ils obtiennent une intoxication nette (paralysie) ;

2°) Une dose submortelle d'un filtrat toxique immunise toujours, qu'il soit prélevé au début, au moment de la toxicité maximum ou après, la dose immunisante variant avec la toxicité. Kraus lui-même le montre, car s'il lui faut 1 et 5 cc. d'une culture de 48 heures pour immuniser, une seule injection de

5 cc. d'une culture de 4 jours donne les mêmes résultats.

Nous-même avons immunisé contre 4 doses mortelles des lapins de 1.500 gr. avec 0 cc. 02 et 0 cc. 033 d'un filtrat de culture de 15 jours tuant à 0 cc. 05.

Ces faits prouvent seulement qu'il y a un parallélisme certain entre la toxicité et le pouvoir antigène. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous avons classé la vaccination dans les « applications de la toxicité du bacille de Shiga ».

CONCLUSIONS

Les vaccins stérilisés par l'action de la chaleur ou l'addition d'un antiseptique ne sont, à vrai dire, que des produits toxiques et, de ce fait, sont impropres à la vaccination de l'homme.

Les vaccins sensibilisés se sont montrés, dans certains cas, sensiblement moins toxiques, mais il n'y avait pas de raison pour que l'antitoxine laisse intact le pouvoir antigène ; aussi les expérimentateurs furent-ils enfermés dans ce dilemme : Vacciner avec un produit neutre à tous points de vue ou injecter un vaccin d'autant plus toxique qu'il est bon antigène.

Nous sommes donc amenés à porter toute notre attention sur les vaccins rendus atoxiques par des moyens physiques et chimiques. Les procédés de RUFFER et WILLMORE et de RAMON semblent avoir

donné les résultats expérimentaux les plus démonstratifs. Le premier présente le grand défaut de n'avoir reçu aucune confirmation depuis 1908.

Bien au contraire, l'« anatoxine » a été simultanément essayée en trois points du globe fort éloignés les uns des autres, et les résultats ont été concordants. Dire que son étude est parfaitement au point serait exagéré. Une « anatoxine totale » faite en soumettant une émulsion de culture sur gélose à l'action du formol, de la chaleur et du temps (ces deux derniers facteurs ayant été négligés par P. Durand), nous donnerait peut-être des résultats encore meilleurs.

Nous pensons que la culture sur gélose âgée de 24 à 48 heures donnerait la meilleure anatoxine car c'est cette culture qui, émulsionnée, donne la meilleure toxine. Procédant par étapes nous essayons actuellement la transformation en anatoxine d'un produit d'autolyse de 24 heures d'une culture sur gélose de 48 heures. Le liquide limpide obtenu, mortel pour le lapin, à la dose de 0 cc. 01 par kgr., transformé en anatoxine, a sur l'anatoxine-bouillon l'avantage d'être presque exempt de produits étrangers. L'incorporation des vaccins dans un véhicule huileux paraît également d'un grand intérêt et pourrait peut-être s'appliquer fort heureusement à la vaccination par anatoxine totale (1).

(1) Nous entendons par là des corps de microbes toxiques soumis à l'action combinée du formol, de la chaleur et du temps puis desséchés et émulsionnés dans le véhicule huileux.

Nous ne voulons pas terminer le chapitre des vaccinations sans dire quelques mots de la recherche des sujets réceptifs à la dysenterie à bacille de Shiga.

Brokmann, en 1923, pratique dans ce but une injection intra-dermique de 0 cc. 1 d'une dilution à 3 % d'une toxine tuant le lapin à la dose de 0 cc. 1 par kgr.

Il constate quelques heures après une tache rouge vif qui 24 heures après est remplacée par un œdème rouge vif qui devient bleuâtre par la suite. Dans certains cas, il y a une petite hémorragie au bout de 48 heures et 8 jours plus tard une escarre insignifiante.

Les sujets à réaction négative ne présentent qu'une petite rougeur qui disparaît en 48 heures.

La réaction est positive dans 80 % des cas.

En 1925, Brokman et Przesmycki publient de nouveaux essais. Ils indiquent que la réaction est due à l'élément toxique et ne se présente pas si on chauffe ou si on neutralise la toxine par l'antitoxine. Les individus qui ont reçu du sérum antidysentérique ne réagissent pas. Les nouveaux-nés réagissent en moins grand nombre que les enfants âgés de quelques mois. Puis, à partir de la première année, le pourcentage des réactions diminue. Enfin, le sérum des individus qui ne réagissent pas aurait des propriétés antitoxiques.

CHAPITRE VII

De l'immunisation des animaux en vue de l'obtention d'un sérum antidysentérique

Dès 1898, SMIGA annonce qu'il procède à des essais d'immunisation et que le sérum antidysentérique est en voie de réalisation. KRUSE, en 1901, dit qu'il est possible, en injectant des cultures de bacilles, de provoquer la formation de substances antitoxiques. Il immunise des moutons mais note que chez cet animal la production de substances spécifiques est faible. En 1903, cet auteur annonce qu'il obtient de meilleurs résultats avec les équidés. La même année GABRITSCHESKI publie la technique d'immunisation qu'il utilise : un cheval de 8 ans reçoit sous la peau, en l'espace de 38 jours, 14 injections de toxine à des doses variant de 0 cc.5 à 5 cc. et atteignant le total de 28 cc. 5. Il présente une réaction locale et générale insignifiante. Dans les 22

jours suivants il reçoit 5 injections d'une culture vivante en bouillon aux doses de 0 cc. 5 à 5 cc., au total 16 cc. 5. La réaction locale et générale est plus marquée ; l'animal maigrit. Dans le cours du mois suivant le cheval reçoit alternativement 1, 3, 5 et 10 cc. de toxine et 5, 6 et 10 cc. de culture vivante. La réaction est faible, le cheval reprend du poids. Au cours du mois qui suit, il est injecté 5, 10, 15, 20 et 30 cc. de toxine et 10, 15, 20 et 30 cc. de culture. Durant cette série la réaction est plus forte mais le poids de l'animal augmente cependant.

Enfin, dans le courant du dernier mois (le 10^e) nouvelle série, grosse réaction générale (température de 40°3) mais augmentation continue du poids.

GABRITSCHESKI signale qu'un autre cheval ayant reçu en 64 jours 89 cc. 5 de toxine et 84 cc. 5 de cultures vivantes a présenté deux fois des abcès après l'injection des bacilles. Son sérum était actif au bout de 3 mois.

ROSENTHAL, en 1904, publie les essais qui lui permirent d'obtenir un sérum antidysentérique chez le cobaye et le chien.

La même année nous trouvons dans le mémoire de TODD un chapitre sur l'immunisation des animaux, dans lequel nous voyons que le lapin immunisé ne lui donne pas d'antitoxine alors que la chèvre est bonne productrice de sérum antidysentérique. Nous y relevons qu'un cheval recevant sous la peau, tous les 3 jours, des doses croissantes de toxi-

ne (dose de départ occ. 5) jusqu'au total de 150 cc. a réagi fortement dès la dose de 2 cc. par de la fièvre et de la diarrhée. A la dose de 8 cc. la diarrhée a reparu. Enfin à la dose finale de 150 cc. l'animal présentant de la paralysie du train postérieur doit être abattu. Todd compare l'activité d'un sérum de cheval ayant reçu 400 cc. d'une toxine tuant le lapin à la dose de 0 cc. 1 (dose initiale 0 cc. 1, élévation lente et progressive, injections à 8 jours d'intervalle) et celle du sérum d'un autre cheval ayant été injecté avec des émulsions de culture sur gélose de 20 heures (1/10 de tube chauffé 30 minutes à 70° au début, puis augmentation progressive jusqu'à 32 tubes. Enfin, injections intraveineuses de bacilles vivants à la dose de 10 tubes de cultures, — œdème après les injections sous-cutanées, fièvre et diarrhée après les intraveineuses). Le sérum obtenu par injection de toxine protège le lapin contre 4 doses mortelles à la dose de 0 cc. 001. Le sérum de cheval immunisé avec des bacilles protège contre 20 doses mortelles à la dose de 0 cc. 001. Cet essai est donc nettement en faveur de l'immunisation avec des bacilles, surtout lorsqu'on remarque que les bacilles chauffés à 70° devaient cependant avoir perdu une partie de leurs qualités antigènes. Kraus et Doerr, en 1906, immunisent des chèvres au moyen d'injections sous-cutanées de cultures vivantes, puis des chevaux au moyen de cultures puis de toxines. En même temps, Vaillard et Dopfer publient les

résultats des essais faits par eux depuis 1903. L'immunisation de leurs chevaux est faite au moyen d'injections hebdomadaires de doses croissantes de bacilles vivants et de toxine (filtrat d'une culture en bouillon Martin de 20 jours tuant le lapin à la dose de 0 cc. 25 en 16 heures).

Dès les premières inoculations, de 1 cc. au maximum, la réaction générale est vive ; un cheval robuste succombe même avec paraplégie complète après inoculation sous-cutanée de 2 cc. de culture en bouillon.

Afin d'augmenter la quantité de bacilles injectés sans accroître celle du liquide, des émulsions de culture sur gélose sont substituées aux cultures en bouillon. Cette émulsion déterminant des abcès, VAILLARD et DOPFER adoptent la voie veineuse, toutefois ils signalent que les accidents ne manquent pas et que l'activité du sérum ne tarde pas à fléchir. Ce fléchissement s'accroît encore si les inoculations sont interrompues durant plus de 15 à 20 jours. En 1907, SKSCHIVAN et STEFANSKY obtiennent un sérum antitoxique par inoculation à un cheval, dans le délai d'un an, de 1.280 cc. de cultures en bouillon de trois semaines, filtrées. L'année suivante, KOLLE, HELLER et DE MESTRAL immunisent des chevaux et des chèvres avec diverses méthodes, les uns avec différentes toxines, les autres avec des bactéries vivantes ou atténuées. Les chevaux sont injectés sous la peau ou dans la veine, les chèvres uniquement sous la peau. Leur conclu-

sion est celle-ci : « Pour la pratique, il s'ensuit que le sérum antidysentérique peut être obtenu aussi bien par l'immunisation avec les corps des bactéries qu'avec les toxines ».

DOPTER, pensant que le sérum antidysentérique doit être anti-microbien et anti-endotoxique, immunise deux chevaux. L'un reçoit sous la peau des corps microbiens et de la toxine, l'autre est inoculé par voie veineuse avec des cultures vivantes. Les deux animaux ayant reçu le même nombre d'injections avec une progression parallèle sont saignés à la même date. Les deux sérums présentent des propriétés préventives et curatives égales. COYNE et AUCHÉ, également en 1908, admettant la pluralité des germes dysentériques, cherchent à obtenir un sérum polyvalent. Ils injectent sous la peau d'un cheval des doses croissantes d'un filtrat d'une culture de 3 semaines en bouillon-Martin durant 3 semaines, puis par voie veineuse des bacilles tués, puis vivants, et enfin un mélange de bacilles de Shiga et de bacilles de Flexner. (tous les 10 jours, 2 à 3 cultures de 48 heures sur gélose de chaque), et, dans l'intervalle, 60 à 75 cc. de toxine filtrée.

En 1910, SELTER immunise un âne à l'aide de cultures tuées, introduites d'abord sous la peau, puis, à fortes doses, dans la veine. Le sérum de l'animal ainsi immunisé se montre nettement antitoxique.

FLEXNER et AMOSS publient leur méthode en 1915. Elle présente cette particularité de ne faire appel

qu'à la voie veineuse seule. Les chevaux reçoivent d'abord des bacilles de Flexner, puis 4 anses de bacilles de Shiga ; 10 anses, le lendemain, et 30 le surlendemain ; après un repos de 7 jours, de nouvelles doses, mesurées d'après la réaction fébrile qui ne doit pas se prolonger au-delà de 24 heures, sont injectées pendant trois jours, avec repos de sept jours, reprise des injections et ainsi de suite. Les auteurs indiquent qu'au bout de 10 semaines, le sérum des chevaux ainsi traités neutralise une dose sûrement mortelle de bacilles de SHIGA et de bacilles de FLEXNER, à la dose de 0 cc. 008.

En 1916, M. NICOLLÉ, DEBAÏNS et LOISEAU immunisent un cheval avec des corps microbiens préalablement séchés, mélangés avec du sulfate de soude et broyés, émulsionnés dans l'eau physiologique. Le cheval ayant reçu 919 cc. d'extrait en deux mois fournit un sérum qui neutralise une dose mortelle en 30 minutes de contact *in vitro* à la température ordinaire, à la dose de 0 cc. 05.

JOTTEN, en 1920, immunise un âne au moyen de bacilles traités par l'antiformine et obtient ainsi un sérum qui se montre très riche en agglutinine et possède un pouvoir préventif. A la même époque, OLITSKY et KLIGLER pensent obtenir un sérum purement anti-exotoxique en injectant dans les veines d'un cheval des filtrats de cultures en bouillon de moins de 5 jours.

En 1921, BUJWID indique qu'il immunise ses che-

vaux à l'aide d'émulsions de cultures jeunes injectées dans les veines aux doses initiales de 2 à 3 milligr. Si la réaction fébrile ne dure pas plus de 24 heures et ne dépasse pas 40°, les injections sont poursuivies après 5 à 6 jours aux doses de 5 à 8 milligr. puis de 15 à 20 milligr. Les injections sont ainsi faites tous les 5 jours à des doses croissantes finissant par atteindre 800 milligr. Au bout de 6 à 8 semaines, il est déjà possible de récolter un sérum actif. BURWID signale qu'après un repos de 10 jours, les injections de la nouvelle série ne doivent alors plus dépasser 1/5 ou 1/8 de la plus forte injection faite précédemment. Il est possible ensuite d'augmenter les doses. Cet auteur note que si les injections sont trop fortes ou trop espacées, le myocarde et le tissu hépatique du cheval sont altérés et celui-ci tombe malade. La question de l'immunisation des animaux producteurs de sérum ne pouvait pas ne pas être posée lors du Congrès du Comité d'hygiène de la Société des Nations. En 1922, HIRTZFELD indiquait dans son rapport qu'il immunise ses chevaux par injections sous-cutanées de toxines et injections intraveineuses de bactéries atténuées ou tuées. SHIGA écrit dans son premier rapport (1922) : « La quantité obtenue en 24 heures d'une culture-agar inclinée est suspendue dans l'eau physiologique à 0,85 %. Une petite dose de cette suspension est injectée — en augmentant graduellement la quantité — par voie sous-cutanée à des chevaux ; le bacille a été préalablement tué par

l'exposition à une température de 60° pendant 30 minutes. Cette injection produit sur les chevaux une tuméfaction locale, la température augmente, ils perdent l'appétit, de temps à autre il se produit des diarrhées. Après quelques jours, quand ces phénomènes ont passé, on augmente la dose de l'injection d'un à deux tiers. Quand la quantité injectée est excessive, il se produit, à l'endroit de l'injection, de la suppuration, l'animal s'affaiblit et on ne peut obtenir un sérum efficace. Le sérum des chevaux immunisés par des injections intraveineuses est également efficace. La culture du bacille dysentérique destinée à l'immunisation doit avoir une forte virulence vis-à-vis de l'organisme. Dans ce but, on se sert de préférence d'une culture prélevée directement du malade, celle qui a passé sur un animal n'est pas efficace ». Nous avons tenu à recopier ce passage du rapport de Shiga (en respectant même la traduction officielle de la S. D. N.), car nous verrons plus loin que le sérum de Shiga est, de beaucoup, le meilleur. DOPTER et DUMAS indiquent, au même Congrès, que leurs meilleurs sérums ont été obtenus en injectant sous la peau des chevaux de l'endotoxine provenant de cultures en bouillon laissées à l'étuve à 37° pendant 8 jours. Au congrès de 1924, SHIGA présente dans son rapport un tableau qui, dans sa simplicité, ne manque pas d'être fort instructif. Examinant la question qui nous occupe avec sa méthode habituelle, SHIGA fait une « comparaison des matériaux utilisés comme antigène. A cet effet, il immunise six chevaux :

Deux avec des cultures de 24 heures sur gélose, émulsionnées dans l'eau physiologique et chauffée une heure à 60° (1 cc. de la suspension contenait 2 mgr. de bacilles).

Deux avec des cultures en bouillon d'une semaine additionnées de 0,5 % d'acide phénique pour tuer les microbes.

Et enfin les deux derniers reçoivent du filtrat de culture en bouillon de deux semaines.

Voici les doses neutralisant en 30 minutes de séjour à 37° vingt doses mortelles :

Immunisation par émulsion de culture sur gélose :

Sérum 128 : 1/200 de cc.

Sérum 129 : 1/100 de cc.

Immunisation par culture en bouillon :

Sérum 136 : 0 cc.

Sérum 137 : 1/30 de cc.

Immunisation par filtrat de culture en bouillon :

Sérum 130 : 1/16 de cc.

Sérum 131 : 0 cc.

Et Shiga ajoute : « La comparaison entre les trois antigènes précédents montre que l'émulsion fraîche de culture sur gélose produit la plus faible réaction chez l'animal, alors que la culture en bouillon ou la toxine filtrée produisent la plus violente réaction. Ceci peut être dû à la présence de protéines non spécifiques dans la culture ». Signalons enfin que l'anatoxine de devait pas tarder à être utilisée

pour l'immunisation des animaux producteurs de sérum. ARLINDO DE ASSIS écrit en effet : « L'inoculation sous-cutanée à des chevaux a déterminé des élévations thermiques passagères et au bout de quelque temps l'apparition de qualités antitoxiques dans le sérum des animaux.

DUMAS, RAMON et BILAL, depuis septembre 1924, injectent à des chevaux des doses progressives (de 10 à 500 cc.) d'anatoxine à 6 ou 8 jours d'intervalle. Le soir de l'injection l'animal a de la fièvre, de l'inappétance, et, localement, un peu d'œdème. Le sérum des chevaux ainsi immunisés présente un bon pouvoir antitoxique.

CONCLUSIONS

Todd et Shiga, à 20 ans d'intervalle concluent à la grande supériorité de l'immunisation par injection sous-cutanée de bacilles. Nous ne pouvons qu'adopter leur manière de voir, et cela d'autant plus facilement que nous avons vu que l'émulsion de cultures jeunes sur gélose était le produit le plus toxique, dont le meilleur antigène et qu'il a le plus de chance de contenir les substances spécifiques les plus complètes et les moins modifiées. D'autre part, tous les travailleurs chargés d'examiner les divers sérums soumis au Comité d'Hygiène de la S. D. N. ont conclu à l'unanimité que le sérum japonais était au moins trois fois meilleur que les autres. Etant

donné qu'avec les autres genres d'antigène, Shiga n'obtient que des résultats semblables à ceux des autres producteurs, il ne peut être question de faire intervenir la race des chevaux employés. Nous ne voulons point écrire, toutefois, que la méthode de Shiga doive être appliquée *ne varietur* ; il est possible qu'avec cette émulsion de culture sur gélose transformée en « anatoxine » par le formol, la température et le temps les résultats soient meilleurs encore.

L'incorporation dans un véhicule huileux serait peut-être aussi avantageuse pour le but que nous poursuivons.

CHAPITRE VIII

De l'Étalonnage du Sérum antidysentérique

C'est Kruse qui, le premier publie un essai de titrage de l'action du sérum par un dosage *in vivo*. Ayant éprouvé le pouvoir curatif du sérum sur l'infection expérimentale du cobaye il fait, le 30 avril 1902, l'expérience suivante :

7 cobayes de 235 à 275 gr. reçoivent la même dose de bacilles dysentériques et des doses différentes de sérum spécifique sec, dissous dans 1 cc. d'eau physiologique, par injection intra-péritonéale.

Un témoin reçoit en plus des bacilles un peu d'eau physiologique. Ce dernier meurt en 20 heures ainsi que le cobaye qui n'a reçu que 1/250.000 de gramme de sérum. Les autres sont préservés.

Rosenthal, la même année, utilise la même technique et constate que le sérum antidysentérique qu'il obtient protège le cobaye à la dose de 1/80.000

de gramme. Il note aussi, comme Kruse, que ce sérum a un pouvoir curatif certain et qu'il sauve un cobaye à la dose de 0 cc. 5 d'une infection mortelle en 48 heures lorsqu'il est injecté 24 heures après l'injection d'épreuve.

Todd, en 1904, vérifie l'action de son sérum antidysentérique par injection du mélange toxine-antitoxine placé préalablement à 37° durant 30 minutes. Il fait également des injections séparées et simultanées et note que la non neutralisation dans ce cas est due à la rapidité de fixation de la toxine sur les tissus. Todd trouve, en outre, que la neutralisation d'une toxine par l'antitoxine se fait en 5 minutes lorsque le mélange est placé à 37° alors que 2 heures sont nécessaires pour obtenir le même résultat avec les mêmes doses lorsqu'elles sont placées à 0°.

Kraus, publiant en 1905, quelques titrages d'antitoxines expose sa théorie que nous retrouverons plus tard dans les travaux de Doerr, théorie suivant laquelle le sérum antidysentérique aurait deux qualités indépendantes l'une de l'autre ; l'une, la puissance serait responsable de la neutralisation *in vitro* ; l'autre, dite « avidité » serait la rapidité de fixation de l'antitoxine sur la toxine. Cette dernière, la plus intéressante pour l'auteur, pourrait se mesurer par des injections séparées de toxine d'abord, d'antitoxine ensuite, à un intervalle plus ou moins grand. Ainsi, par exemple, un sérum très « avide », injecté 30 minutes après la toxine, parviendrait à neutraliser celle-ci avant sa fixation sur les tissus sensibles,

alors qu'un sérum peu avide serait inefficace parce qu'incapable d'agir à temps. Nous prélevons dans le mémoire publié en 1906 par KRAUS et DOERR cet exemple concret :

Le sérum de la chèvre n° 7, le 14 novembre, neutralise la dose mortelle *in vitro*, mais ne peut le faire lorsqu'on injecte séparément et simultanément toxine et antitoxine. Le 8 janvier, ce sérum a toujours le même pouvoir neutralisant *in vitro*, mais au cours de l'immunisation continuée il a acquis le pouvoir de neutraliser une dose de toxine injectée quelques secondes auparavant. La même année, BESREDKA, étudiant l'action du sérum anti-dysentérique de VAILLARD et DOPTER, écrit : « L'animal de choix est sans conteste la souris blanche ». C'est le début de la question de « l'animal réactif » qui a, ces dernières années, préoccupé beaucoup les commissions de la S. D. N. BESREDKA injecte dans le péritoine des souris un mélange de sérum et de bacilles séchés et broyés avec du chlorure de sodium et autolysés ensuite. VAILLARD et DOPTER, à la même époque, éprouvent leur sérum sur des lapins au point de vue préventif (sérum 24 heures avant la toxine) ou curatif (sérum 24 heures après la toxine).

COYNE et AUCHÉ utilisent également le lapin.

En 1908, KOLLE, HELLER et DE MESTRAL, employant la technique des injections séparées de KRAUS et DOERR, signalent que les résultats sont très irréguliers, alors que la méthode des mélan-

ges donne des séries bien plus régulières. Ils préfèrent les dosages par injections intrapéritonéales à la souris aux injections intraveineuses chez le lapin. PFEIFFER et UNGERMAN choisissent le titrage par mélange injecté dans la veine du lapin, ainsi que SELTER, qui déclare en outre le cobaye tout à fait impropre à ce titrage. En 1918, SACHS et GEORGI préconisent les injections dans les veines caudales de la souris blanche. Ayant vérifié la constance de la réaction chez la souris injectée dans le péritoine selon les données de KOLLE et de ses collaborateurs, ils soulignent que l'action de la toxine étant plus forte par voie veineuse, les différences de sensibilité sont diminuées d'autant, ce que KRAUS et DOERR avaient déjà indiqué pour le lapin.

Par contre, SACHS et GEORGI prétendent que le temps de contact du complexe toxine-antitoxine n'a pas une grande importance. Ces deux auteurs proposent, pour éviter les erreurs provenant des variations de pouvoir de la toxine, de prendre un sérum-étalon comme point de comparaison. Cette idée, émise par eux pour la première fois, sera souvent reprise par la suite. Dès l'année suivante, en effet, FUKUHARA publie une méthode très complète qui fut reproduite ensuite par divers auteurs dans leurs rapports à la Société des Nations. FUKUHARA, après avoir démontré par des expériences que la technique des injections séparées de KRAUS et DOERR donne des résultats irréguliers et doit, en conséquence, être rejetée, écrit : « Mes propres ex-

périences comparatives m'ont convaincu également que la détermination de la valeur curative et immunisante des sérums antidyentériques est faite avec le maximum d'exactitude par la méthode des mélanges », et plus loin : « La méthode de titrage du pouvoir antitoxique oblige nécessairement à établir un étalon de mesure uniforme ; la toxine dysentérique perdant graduellement de sa toxicité même lorsqu'elle est protégée contre les influences nuisibles, cela nous a conduit à adopter comme étalon de mesure une unité arbitraire de l'antitoxine stable, comme cela a été fait par EHRLICH pour la diphtérie ».

Ayant choisi arbitrairement la dose de sérum neutralisant cent doses minima mortelles, comme unité étalon de sérum antitoxique, FUKUHARA recherche quel est le Lo et le L+ d'une toxine par rapport à son étalon d'antitoxine.

Le Lo (dose non letale) d'une toxine est la quantité maximum de cette toxine qui est neutralisée entièrement par l'étalon d'antitoxine.

Le L+ (dose letale) est la dose minimum d'une toxine qui, mélangée à l'étalon d'antitoxine, est régulièrement mortelle.

FUKUHARA mélange à l'unité d'antitoxine des doses de toxine allant de 0 cc. 8 à 2 cc. 6., tous les lapins recevant les mélanges contenant moins de 1 cc. 01 de toxine résistent et tous ceux qui reçoivent 2 cc. 4 de toxine ou plus meurent. Le Lo de cette toxine est de 1 cc. et son L+ de 2 cc. 4.

L'auteur japonais conclut de ses expériences que le L+ est plus facile à déterminer que le Lo et il ajoute que dans tous les titrages il est bon d'employer un nombre d'animaux tel que la difficulté résultant des différences individuelles soit surmontée.

Ayant déterminé le L+ d'une toxine par rapport à l'étalon d'antitoxine, il ne reste plus qu'à rechercher par un titrage semblable sur l'animal la plus forte dose du sérum à titrer qui, mélangée à la dose L+ de la toxine, permet cependant à celle-ci de tuer régulièrement l'animal. Ainsi, s'il faut ajouter 0 cc. 02 du sérum à examiner pour neutraliser la dose L+ de toxine et si 0 cc. 01 est incapable de sauver l'animal ayant reçu cette dose, nous pouvons dire que 0 cc. 01 de ce sérum vaut une unité antitoxique et que par conséquent 1 cc. contient 100 unités. FUKUHARA indique également qu'une toxine dysentérique perd en même temps son pouvoir toxique et son pouvoir fixateur.

Signalons en passant que SORDELLI propose, en 1920, de choisir comme animal réactif un petit oiseau, le « *Sicalis luteola* », connu en Amérique du Sud sous le nom de « Misto ». Cet animal, du poids de 15 à 20 gr. inoculé dans les muscles pectoraux serait 2,5 fois plus sensible que le lapin à la toxine dysentérique.

En 1922, a lieu à Paris la deuxième conférence internationale de la « standardisation » des sérums, organisée par le Comité d'Hygiène de la Société des

Nations. Dans son premier rapport, HIRSZFELD se préoccupe uniquement du dosage qualitatif des sérums antidysentériques et pas de l'étalonnage. Notons toutefois que d'après ces titrages la loi des proportions multiples ne semble pas être respectée par le sérum antidysentérique. « C'est ainsi, écrit-il, que 0 cc. 005 de sérum neutralisent 5 doses mortelles, mais qu'en utilisant 50 doses mortelles, il est nécessaire d'utiliser non pas 0 cc. 05, mais bien 0 cc. 25 ». Nous verrons plus loin la façon dont Shiga réfute cette opinion.

DOERR, également, ne se préoccupe, dans la première partie de son rapport, que du dosage de la toxine ; cependant il y a dans ses conclusions un passage dont nous pouvons tirer parti : « Chez les souris, les résultats des inoculations intraveineuses sont considérablement modifiés lorsqu'on n'injecte pas la dose exacte. C'est évidemment aussi le cas chez les lapins, mais le danger d'inexactitude est moins grand. Chez la souris blanche, il est bien plus difficile d'injecter exactement le volume voulu dans la veine caudale : 1° parce qu'il ne faut pas dépasser le volume de 0 cc. 5 ; 2° parce que la souris présente une sensibilité extrême aux embolies causées par l'introduction d'air ; 3° parce que l'introduction de l'aiguille, même pour des personnes spécialement entraînées, est plus difficile que l'introduction de cette aiguille dans la veine de l'oreille du lapin ». Dans la deuxième partie de son rapport, DOERR publie des titrages

de sérums effectués en faisant varier la dose de sérum en présence d'une quantité constante de toxine, cette quantité étant toujours un multiple de la dose sûrement mortelle.

La neutralisation est effectuée *in vitro* selon la méthode dite « des mélanges » ou *in vivo* selon la méthode de KRAUS et DOERR dite « des injections séparées ».

Pour cette dernière technique, DOERR n'utilise que des lapins ; pour la première, il fait usage de souris blanches et de lapins.

De ces comparaisons, DOERR conclut lui-même : « Il est très douteux que, lorsqu'on détermine le titrage par la méthode des injections séparées, on mesure une propriété du sérum qui doive ou qui puisse être considérée comme véritablement importante au point de vue de l'efficacité curative des sérums antitoxiques dans la dysenterie de l'homme. En outre, la série des résultats donnés par la méthode de séparation est aussi très irrégulière ».

DOERR termine en comparant cinq sérums différents d'après leur pouvoir de neutralisation de 8 doses mortelles d'une toxine d'épreuve donnée.

O'BRIEN préconise l'emploi d'une toxine-étalon et dit que des bacilles desséchés ont conservé le même pouvoir toxique 4 et 10 ans. Enfin, DOPTER annonce qu'il a dû renoncer au titrage sur le lapin « en raison de l'inégalité des réactions observées d'un animal à l'autre vis-à-vis de l'endotoxine », et trouve que la souris est l'animal de choix, les résultats

obtenus par lui étant sensiblement les mêmes, qu'il ait employé la voie sous-cutanée ou la voie veineuse.

La commission du sérum antidysentérique conclut de ces travaux qu'il faut continuer les expériences sur des lapins d'un poids de 15 à 1.600 grammes et sur des souris blanches de 15 grammes et que les titrages doivent être faits par mélange.

La commission se réunit à nouveau en 1924 et examine de nombreux rapports :

ZANGGER reproduisant à peu de choses près les travaux de DOERR préconise un premier titrage grossier sur la souris, titrage « ajusté » ensuite plus exactement sur quelques lapins. Il constate que le lapin réagit régulièrement alors que la souris blanche donne des résultats moins précis, certaines ne réagissent pas à des doses sûrement mortelles, ce qu'il n'a jamais observé chez le lapin. De plus, en comptant par gramme d'animal la souris est de 10 à 30 fois moins sensible. Toutefois la souris étant moins rapidement intoxiquée se prête mieux aux dosages par inoculations séparées. ZDANSKY et HERZOG concluent également en faveur de la méthode des mélanges appliquée sur les lapins. Ils utilisent une toxine-étalon. SCHLOSSBERGER, comparant un sérum anglais, un sérum allemand et un sérum japonais, trouve que le second est trois fois plus antitoxique que le premier et que le troisième est seize fois supérieur au second. HIRSZFELD, dans son deuxième rapport, écrit : « Si nous admettons la possi-

bilité du titrage sur la souris nous pouvons faire remarquer que les lapins, quoique plus coûteux, sont de meilleurs agents ». Il préconise l'emploi d'un sérum étalon avec lequel, contrairement à FUKUHARA, il trouve plus facile de déterminer le Lo. Enfin cet auteur indique que les titrages lui ont paru plus réguliers lorsque 5 à 10 doses mortelles sont utilisées. MADSEN compare un sérum anglais, un sérum allemand, un sérum polonais et un sérum japonais avec la technique suivante : Injection intraveineuse chez la souris de 15 à 20 gr. (une souris de 20 gr. et une souris de 15 gr. pour chaque dose) de 0 cc. 5 du mélange toxine-antitoxine laissé en contact 30 minutes. Les titrages sont faits avec deux toxines, corps microbiens séchés et filtrat de culture en bouillon. Il conclut que les souris sont de bons animaux réactifs à condition qu'elles soient de poids variant entre 15 et 20 gr. Il ajoute que l'adoption d'un sérum étalon est absolument nécessaire. De ses titrages comparatifs il résulte que le sérum japonais est, de beaucoup, le meilleur, le sérum polonais venant ensuite devant le sérum anglais et le sérum allemand. SEIGO KONDO montre que le lapin est, par rapport au poids, 15 fois plus sensible que la souris. Cependant il conclut : « Sans considérer le coût, le lapin n'offre pas les avantages que lui attribuent certains auteurs. Les résistances individuelles sont plus marquées chez cet animal et les résultats sont plus exacts avec la souris ». Il rejette

la méthode des injections séparées comme en donnant des résultats irréguliers.

O'BRIEN après avoir proposé la toxine qu'il prépare comme étalon demande que les titrages soient effectués sur la souris, à la condition que chaque dose soit injectée à deux ou trois souris au moins, plus si quelques irrégularités apparaissent. De plus, O'BRIEN laisse des souris non injectées avec les souris injectées, pour servir de témoins en cas de décès pour des causes non spécifiques. MAC CONKEY déplore qu'il n'existe pas encore de procédés de titrage *in vitro* le dosage *in vivo* ne lui paraissant pas être de toute sécurité. En attendant, il donne la préférence aux titrages faits sur le lapin par la méthode des mélanges parce que cette technique est simple, ne nécessite pas une adresse spéciale et donne des résultats dans un temps raisonnable. Pour NEUFELD la souris est l'animal de choix à cause de son prix modique et parce que les valeurs obtenues avec cet animal sont parallèles à celles obtenues avec le lapin. Toutes les formes de toxines sont utilisables pour la détermination du L+.

JONESCO-MIHAIESTI et COMBIESCU utilisent la technique des mélanges injectés par voie veineuse chez le lapin et la souris et se déclarent contents des résultats obtenus avec la souris qui présente des différences individuelles moindres quoique bien moins sensible que le lapin. Nous avons gardé pour la fin les deux rapports de SHIGA. Dans le premier SHIGA démontre, fait important, que c'est par une fausse

interprétation des faits que l'on a pu conclure que la neutralisation du mélange toxine-antitoxine dysentériques ne suivait pas la loi des multiples. En effet, lorsqu'une faible quantité de sérum préserve contre une dose de toxine cela n'implique pas forcément une neutralisation absolue de cette toxine et on conçoit parfaitement qu'il puisse alors rester non neutralisée une dose sub-mortelle de toxine. Multiplions le tout par 10, les 10 doses de sérum neutraliseront bien les 10 doses correspondantes de toxine mais la dose sub-mortelle non neutralisée dans la première expérience, étant aussi multipliée par 10 a de fortes chances de devenir une dose sûrement mortelle. SHIGA en conclut que le $L +$ peut être bien mieux déterminé avec de grandes quantités de toxine. Il ajoute que, si toutes les formes de toxine peuvent être utilisées, le produit d'autolyse de culture sur gélose, contenant le moins de substances étrangères pouvant être causes d'erreurs, doit être choisi. SHIGA injectant dans le péritoine de la souris un mélange de bacilles et de sérum pense titrer le pouvoir bactéricide de ce dernier.

Dans son second rapport SHIGA réédite la technique de FUKUHARA sous le nom de « Détermination de la valeur antitoxique par la valeur toxique indirecte ». SHIGA choisit une unité antitoxique arbitraire et recherche vis-à-vis d'elle le $L +$ d'une toxine. Son étalon d'antitoxine est la dose du sérum sec n°

128 qui neutralise exactement 20 doses minima mortelles pour un lapin d'un kilog (1 gr. de ce sérum neutralisant 120.000 fois cette dose mortelle ce sérum titre donc 6.000 unités).

Ayant déterminé le L + de plusieurs toxines SMICA dose plusieurs sérums sur la quantité de toxine indiquée et une simple règle de trois lui permet de trouver le nombre d'unités antitoxiques contenues dans les sérums examinés.

Nous reproduisons, pour terminer les conclusions de l'auteur japonais au sujet de l'animal de choix :

« 1° La sensibilité des souris à la toxine dysentérique vient après celle du lapin qui est l'animal de choix. Les rats et les cobayes sont très résistants ;

2° Les souris peuvent être utilisées pour le titrage du pouvoir antitoxique des sérums antidysentériques mais comme leur susceptibilité à la toxine est moindre que celle du lapin les résultats des dosages ne sont pas si exacts que lorsqu'on utilise le lapin ;

3° Les résultats de ces titrages sur la souris ne sont pas uniformes ;

4° Les rats et les cobayes ne sont pas utilisables pour les titrages de toxine et d'antitoxine ».

Tout récemment enfin MADSEN adressait à ses collègues de la commission du sérum antidysentérique une petite quantité d'un sérum desséché puis dissout à la proportion de 1%, dans une solution formée de deux tiers de glycérine et d'un tiers de solution saline. Madsen, possédant un stock de 1.200 gr. de ce sérum sec, le propose comme sérum étalon,

l'étalon d'antitoxine étant la dilution au trois centième de la solution à 1 % de ce sérum (soit 10 doses minima mortelles). Il adresse également à ses collègues une toxine sèche dite étalon avec laquelle il demande que les titrages soient effectués. Nous avons pu nous rendre compte que cette toxine présentait l'inconvénient de se dissoudre mal et n'avait plus, lorsque nous l'avons titrée, le pouvoir toxique qu'elle avait présenté à Copenhague.

CONCLUSIONS

Ici les conclusions suivantes s'imposent :

Le titrage et l'étalonnage des sérums antidysentérique doivent être effectués par la méthode de Fukuhara, soit :

a) Choix d'un étalon d'antitoxine. Quantité prise arbitrairement d'un sérum antidysentérique stabilisé par un procédé sûr.

b) Recherche du L + d'une toxine quelconque. Toutefois nous dirons avec Shiga que le produit d'autolyse de culture sur gélose est la meilleure forme comme étant la plus forte et la plus pure.

Il est bien entendu que le L + d'une toxine est la plus petite dose qui, mélangée à l'étalon d'antitoxine, amène régulièrement la mort de l'animal.

c) Recherche du L + du sérum à titrer, inversement le L + d'un sérum est la plus forte dose de

celui-ci qui mélangé à la dose L + de la toxine déterminée d'après l'étalon d'antitoxine, laisse cependant cette dose de toxine tuer régulièrement l'animal. Le L + d'un sérum étant égal à l'étalon d'antitoxine, ce sérum contiendra autant d'unités antitoxiques que sa dose L + déterminée par l'expérience est contenu de fois dans un centimètre cube.

d) Fixation de la durée du contact préalable. Il serait bon qu'un temps de contact du mélange à 37° soit fixé. Signalons à ce sujet une cause d'erreurs sur laquelle personne n'a insisté : S'il est admis que le temps de contact a une grande importance il ne faut pas faire tous les divers mélanges, les placer à l'étuve puis les retirer après le laps de temps fixé pour commencer les injections, car, si le titrage est effectué sur un grand nombre d'animaux, les premiers mélanges sont bien injectés après le temps de contact fixé, mais les derniers peuvent l'être après 30 minutes, même parfois une heure de contact supplémentaire.

2° L'animal-réactif de choix est le lapin, mais il faut choisir des lapins de même poids et de même couleur (les lapins blancs semblent les plus sensibles, les lapins noirs étant les plus résistants). Par mesure d'économie la souris blanche de 15 à 20 gr. peut être choisie, mais il est nécessaire de répéter chaque dose sur trois individus au moins.

De la Flocculation

Nous avons vu précédemment que MAC CONKEY regrettait qu'une technique de dosage *in vitro* ne vienne pas remplacer avec toute la rigueur d'une réaction physico-chimique les titrages *in vivo* dans lesquelles les diverses susceptibilités individuelles apportent des causes d'erreur qu'il est impossible de mesurer. N'y avait-il donc aucun procédé de titrage *in vitro*? Les premiers expérimentateurs essayèrent bien d'apprécier la valeur de leur sérum par des épreuves d'agglutination ou de fixation du complément, mais l'on se rendit compte rapidement que les agglutinines n'avaient rien de commun avec les antitoxines et ne représentaient aucune vertu intéressante pour un sérum antidysentérique curatif. Quant au second procédé, tout le monde sait que s'il permet de prouver l'existence, ou l'inexistence d'une qualité, il est incapable pratiquement d'en mesurer la quantité.

Cependant au Congrès de Genève, DOPTER et DUMAS annonçaient qu'ils étaient en train d'étudier un procédé de titrage du sérum antidysentérique calqué sur le titrage du sérum antidiphthérique par le phénomène dit de la « *flocculation* » étudié et mis

au point par RAMON. Nous ne referons pas ici l'étude des travaux de Ramon qui ont été rapidement connus dans le monde entier mais au contraire nous nous cantonnerons dans le sujet que nous avons choisi : la toxicité du bacille de Shiga et ses applications

En ce qui concerne le sérum antidysentérique la floculation est un sujet presque neuf. ROSENTHAL cependant, en 1903, avait vu que dans un mélange de toxine et d'antitoxine dysentérique il se produisait un précipité floconneux mais la question du sérum antidysentérique était alors trop jeune pour que cet auteur put en tirer parti. En 1925, ARLINDO DE ASSIS publie les essais qu'il a faits avec la toxine et l'antitoxine dysentérique d'après les travaux de RAMON qui signala d'ailleurs que le phénomène de la floculation était également produit par le sérum antidysentérique lorsqu'il est mélangé à la toxine correspondante.

Arlindo de Assis constate que : 1° le filtrat de culture en bouillon de 21 jours donne le phénomène et que l'addition de formol ne l'empêche pas ; 2° Le sérum de cheval normal et le sérum antidiphthérique ne provoquent pas la floculation lorsqu'ils sont mélangés à une toxine dysentérique. 3° Le sérum antidysentérique mélangé à des toxines hétérologues ne donne pas plus le phénomène.

L'auteur brésilien trouve cependant qu'il y a des irrégularités dans le pouvoir floculant des sérums. Il lui arrive de ne pas observer de floculation avec

un sérum qui donnait le phénomène quelque temps auparavant et inversement. Il signale que le liquide d'autolyse d'une culture sur gélose de 24 heures donne le phénomène beaucoup plus rapidement et d'une façon beaucoup plus visible que la toxine-bouillon.

Arlindo de Assis dit également que la floculation a été plus rapide et plus accentuée là où les éléments toxine et antitoxine tendaient à s'équilibrer. Dans des essais comparatifs l'auteur trouve que 5 fois le pouvoir curatif (procédé de Kraus et Doerr) correspond à la floculation, qu'une fois ni la floculation ni le pouvoir curatif n'existent et qu'une fois il y eut floculation mais que le sérum ne protégea pas. AR-LINDO DE ASSIS, ne trouvant pas de floculation avec un sérum qui ne fut jamais curatif et trouvant qu'un autre sérum acquiert des propriétés curatives indépendantes de son pouvoir floculant conclut : « On ne peut conclure à un rapport entre les pouvoirs antitoxiques (neutralisant et curatif) d'un sérum et ses aptitudes à floculer ».

En même temps, comme DOPTER et DUMAS l'avaient annoncé, des expériences se poursuivaient à l'Institut Pasteur, consistant surtout en des titrages *in vivo* et des floculations faites comparative-ment par DUMAS et S. BILAL. Nous aurons occasion tout à l'heure, de reproduire les résultats obtenus.

Etudiant les produits toxiques du bacille de Shiga nous ne pouvions laisser de côté le phénomène de la floculation ; mais, par le fait même que notre étu-

de personnelle porte plus sur la toxine que sur l'antitoxine, nous avons pris la question à l'inverse des autres expérimentateurs, ce qui nous a permis également d'économiser les animaux d'expérience.

Pour voir le phénomène nous avons réparti dans douze tubes à hémolyse des quantités égales de toxine d'autolysat (5 cc.) et des doses croissantes d'un sérum antidysentérique choisi arbitrairement. Ne connaissant pas le pouvoir neutralisant du sérum et le pouvoir fixateur de la toxine nous avons choisi les doses de sérum de telle sorte que le premier tube ne soit sûrement pas neutralisé et le dernier au contraire soit hyperneutralisé. Chaque mélange ayant été bien agité nous l'avons placé à l'étuve à 37.

Au bout de 3 heures nous avons remarqué que certains mélanges devenaient troubles et au bout de 4 heures il est apparu dans un tube des sortes de flocons blanchâtres ayant tendance à se sédimenter lentement au fond du tube. Dans ce liquide d'autolyse de culture sur gélose presque incolore cette *floculation* est parfaitement visible sans aucun artifice et ne saurait être mieux comparée qu'à une chute de neige. Ayant observé le phénomène nous avons voulu, sa spécificité ayant déjà été démontrée par ARLINDO DE ASSIS, nous rendre compte de la constance du phénomène. Pour cela nous avons, en présence du sérum choisi précédemment, essayé toutes les formes de toxines limpides (cette condition est en effet nécessaire pour observer le phénomène qui,

dans une émulsion bactérienne, se confondrait avec l'agglutination ou resterait invisible). Nous avons constaté que :

1° Le filtrat d'une culture en bouillon de 15 jours, quelle que soit la composition ou la réaction de ce bouillon donne lieu au phénomène.

2° Les produits d'autolyse de cultures sur gélose ont la même propriété que cette autolyse soit faite en eau salée ou en eau distillée, que les bacilles soient tués par la chaleur ou par le chloroforme.

3° Les toxines précipitées par le sulfate d'ammoniaque, séchées puis redissoutes en eau physiologique ou en eau distillée flocculent avec la même proportion de sérum qu'avant leur traitement par le sulfate d'ammoniaque.

4° La toxine sèche de l'Institut Pasteur (mélange de corps microbiens et de sulfate de soude, autolysée, ne donne pas la réaction. Mais si, en ajoutant du sulfate de soude au produit d'autolyse, nous arrivons à précipiter la toxine que nous recueillons ainsi débarrassée de son sulfate de soude, et si nous redissolvons ce précipité, la flocculation se produit dans le liquide limpide ainsi obtenu.

5° Cinq toxines préparées avec cinq souches différentes de bacille de Shiga, ont donné le phénomène.

6° Tous les sérums antidysentériques essayés (au nombre de 14) ont provoqué la flocculation de la toxine dysentérique. Jamais ces sérums, essayés à diverses saignées des chevaux, n'ont perdu ce pouvoir.

Nous pouvons donc conclure que la floculation du complexe toxine-antitoxine dysentérique est un phénomène constant ne dépendant que de la spécificité des deux éléments du complexe. Les autres facteurs : composition du milieu, réaction du milieu ou de la verrerie n'ayant aucune influence, au moins dans les limites des expériences courantes de laboratoire. Un seul facteur étranger intervient, uniquement d'ailleurs dans la rapidité de la réaction. Nous voulons parler de la température. En effet une floculation qui se fait dans un mélange donné, après quatre heures de séjour à l'étuve à 37°, a lieu en une heure environ, parfois moins, au bain-marie à 45°.

Comment faut-il donc expliquer les irrégularités observées par Arlindo de Assis et parfois aussi par les expérimentateurs de l'Institut Pasteur?

Nous l'avons recherché en partant de ce principe général que si une réaction qui doit se produire ne se produit pas c'est qu'un des éléments fait défaut. En effet nous n'avons pas tardé à nous rendre compte que lorsqu'une floculation n'avait pas lieu c'était parce que le mélange en proportions convenables de toxine et d'antitoxine n'existait pas. Il suffit en effet dans ce cas, de recommencer l'expérience avec des quantités plus petites ou plus grandes de sérum pour voir la floculation apparaître. Les irrégularités observées ne sont donc pas dues à la réaction elle-même mais aux irrégularités des éléments ou aux erreurs d'appréciation de leurs valeurs respectives par l'opérateur.

La constance de la réaction ne faisant plus de doute il restait à rechercher sa signification.

Profitant de ce que nous recherchions la toxicité de diverses toxines par dosages sur le lapin, nous avons, au moyen d'un sérum étalon, comparé les diverses toxines au point de vue de la floculation.

Nous nous sommes, alors, rendus compte qu'en présence d'une quantité donnée de diverses toxines il faut des quantités différentes d'un même sérum pour obtenir la floculation. De plus *cette dose de sérum doit être d'autant plus élevée que la toxine est plus forte.*

Exemple :

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en décoction de veau flocule avec 1 cc. 4 du sérum n° 34.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en décoction de cheval flocule avec 1 cc. 2 du sérum n° 34.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en macération de cheval flocule avec 1 cc.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en macération de veau, flocule avec 1 cc.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en décoction de bœuf, flocule avec 0 cc. 8.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en macération de bœuf, flocule avec 0 cc. 8.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en décoction de poisson, flocule avec 0 cc. 4.

10 cc. de filtrat de culture de 15 jours en macération de poisson, flocule avec 0 cc. 2.

Numéros des serums utilisés

	26/5	20/6	4/7	10/7	1/8	7/8	5/9	11/9	15/9	20/9	20/9	21/10	10/11	4/12	10/12	11/12
15	0,4		0,25		0,7			0,4		0,2			0,2			
114	0,8	0,3							0,6							
100			0,8			0,8	0,7	0,5				0,6			1,2	0,4
33		0,6		0,5	0,5					0,8	0,8	0,8		3,2		
34	0,5	0,5		7						1,2	1,2	1,2				0,6
38	0,6	0,6			0,6				1,6			1,2	2,8	1,4		
57	0,8	7												2		
98			7		1,1	0,6	1,3								1,6	
105		7				1,4	0,9	0,9	0,7						2,6	2
66		0,3														
27								0,9				1,4	3	2,6	4,4	3,6
						7										

Résultats

Or, cet ordre est celui que nous avons trouvé pour la valeur toxique des cultures en milieu liquide dans notre second chapitre.

Le phénomène de la floculation respecte la loi des proportions multiples.

Exemple : 10 cc. du filtrat de bouillon de bœuf peptonée à 2 % flocculent en présence de 0 cc. 2 du sérum n° 15.

Pour obtenir la floculation avec 20 cc. de cette toxine, il faut ajouter 0 cc. 4 et pour observer la réaction avec 5 cc. de toxine il faut 0 cc. 1 du sérum.

La réaction de floculation permet donc de doser la toxicité de toxines par rapport à un sérum. La réciproque doit, à priori être vraie. Nous nous contentons de donner ici un tableau des résultats obtenus avec douze sérums différents, dans 16 titrages faits à des dates différentes avec des toxines différentes (1). Le lecteur pourra remarquer que la classification des sérums, d'après leur pouvoir de floculation est très constante et que les chiffres obtenus dans chaque série sont en rapport avec la toxicité de la toxine utilisée.

Dans tous ces titrages nous ne relevons que cinq chiffres discordants, résultats dus surtout aux tâtonnements d'une technique trop jeune. Et cela nous amène à dire quelques mots des « floculations irrégulières ».

Nous n'avons tenu compte jusqu'ici que d'une seule floculation, celle qui se produit la première ; le phénomène se produit pourtant dans d'autres tu-

bes. Reprenons, pour la clarté de cette question, la série de tubes contenant une dose constante de toxine et des doses croissantes de sérum. Au bout de 4 heures d'étuve ou d'une heure de chauffage à 45° la floculation s'est produite dans un tube dont nous avons noté la dose de sérum et qui nous sert pour nos titrages. Si nous continuons à observer notre « échelle » de floculation nous voyons bientôt le tube contenant la dose inférieure à celle qui a été notée tout à l'heure et le tube contenant la dose supérieure présenter la réaction, puis un autre tube voisin et ainsi de suite. Finalement, au bout de 1 h. 30 de chauffage à 45° le tube dit *floculant* est entouré, vers la gauche (doses inférieures) de deux ou trois autres tubes présentant des floculations secondaires et vers la droite (doses supérieures) de trois, quatre ou cinq tubes offrent le même aspect. Enfin, au bout de 3 ou 4 heures de séjour au bain-marie, il se produit une floculation retardée dans un tube contenant une dose de sérum très inférieure à la *dose floculante*. Si, donc, nous avons mal choisi les doses de sérum à ajouter à la toxine nous pouvons observer à défaut de la première floculation, des floculations secondaires ou la floculation retardée et notre titrage sera faussé. A l'heure actuelle, il nous est difficile de dire quelle est la signification biologique de ces floculations. Nous savons seulement que nous pouvons impunément injecter à l'animal des quantités énormes (3 à 4 cc.) d'un mélange de toxine et d'antitoxine aux doses indiquées par

la première floculation, mélange laissé 30 minutes à 37° suivant la technique habituelle des titrages *in vivo*. L'animal ne réagit généralement pas du tout, rarement il présente une perte de quelques dizaines de grammes. Les doses immédiatement inférieures qui présentent la floculation secondaire laissent l'animal réagir fortement, mais arrivent cependant à le sauver et il faut injecter les tubes contenant des doses inférieures ne provoquant pas la floculation pour tuer l'animal à coup sûr. (Voir protocole VII). La dose de sérum provoquant l'apparition de la première floculation est-elle la « dose curative » de Kraus et Doerr et la dose la plus faible provoquant la « floculation secondaire » est-elle le L_0 ? Nous n'osons l'affirmer, nos expériences sur l'animal étant trop restreintes à l'heure actuelle. Quant à la « floculation retardée », nous ne lui entrevoyons aucune signification. Peut-être est-elle due à un mélange incomplet provoquant une neutralisation partielle ?

En tous les cas, la réaction étant constante, parallèle au pouvoir des toxines et à la valeur des sérums, il nous semble possible de baser, dès à présent, une technique de titrage et même d'étalonnage des sérums antidysentériques. La comparaison entre ce mode d'étalonnage et le titrage par la méthode de Fukuhara, faite par beaucoup d'expérimentateurs, ne manquera pas, croyons-nous, de mettre en valeur le rôle important de la floculation.

Déjà, nous avons pu constater que la classifica-

tion des sérums n^{os} 15, 100, 33, 38 et 57, établie dans cet ordre grâce à la réaction de floculation, était absolument parallèle à la classification faite d'après les titrages sur la souris (par voie veineuse). Mais nous avons pu nous rendre compte par nous-mêmes des causes d'erreurs qui interviennent dans la technique des inoculations intraveineuses chez la souris et des irrégularités qui en découlent. Aussi avons-nous dû baser notre classification sur une moyenne de cinq dosages *in vivo*. (Voir protocole n^o VIII).

CÔNCLUSIONS

En matière de conclusions, nous donnerons une technique d'étalonnage de sérums antidysentériques telle que nous la concevons d'après nos expériences.

*
**

Technique d'étalonnage des Sérums antidysentérique par les Procédés de Floculation

1^o Déterminer la dose d'un sérum étalon qui, en présence d'une quantité donnée d'une toxine choisie, donne lieu à la floculation la plus rapide.

Lorsque le pouvoir du sérum et la toxicité de la toxine sont inconnus, il y a intérêt à établir une première échelle avec 5 cc. de toxine et des doses

espacées de sérum pour recommencer l'expérience avec 10 ou 20 cc. de la toxine et des doses de sérum très rapprochées les unes des autres, en ne faisant que les mélanges correspondants aux floculations primitives et secondaires de la première échelle (multiplier les doses de sérum par 2 ou par 4 suivant que l'on utilise 10 ou 20 cc. de toxine). Il est également préférable d'utiliser un produit d'auto-lyse de cultures sur gélose, ce produit, rendu limpide par filtration sur bougie Chamberland F, ayant l'avantage de donner le phénomène de la façon la plus rapide et la plus visible.

2° Déterminer, de la même façon, la dose du sérum à examiner, qui, avec cette même toxine, provoque le même phénomène.

3° La quantité d'unités antitoxiques contenues dans un centimètre cube de sérum à titrer est donnée par la formule :

$$X = \frac{U \times a}{b}$$

U : étant la quantité d'unités antitoxiques contenues dans 1 cc. du sérum étalon.

a : étant la dose de ce sérum étalon qui provoque la floculation.

b : étant la dose du sérum à examiner donnant lieu au même phénomène.

Exemple : Le sérum étalon E contient 200 unités

par centimètre cube. Il provoque la floculation d'une toxine T à la dose de 1 cc. 2.

Le sérum X à titrer donne la même réaction, avec la toxine T à la dose de 0 cc. 4.

Nous pouvons donc écrire :

0 cc. 4 du sérum X = 1 cc. 2 du sérum E.

Or, 1 cc. 2 du sérum E contiennent $200 \times 1,2 = 240$ unités antitoxiques.

Donc, 0 cc. 4 du sérum X = 240 unités.

Et 1 cc. du sérum X = $\frac{240 \times 10}{4} = 600$ unités

Ou plus simplement X = $\frac{200 \times 1,2}{0,4} = 600$ unit.

Conclusions générales de ce Travail

1° La toxicité du bacille de Shiga cultivé *in vitro* dépend de la composition, de la réaction et de l'aération du milieu de culture.

a) Le meilleur milieu est la décoction de viande de veau additionnée de 25 grammes de peptone Chapoteaut par litre, de 5 grammes de phosphate monopotassique et de 2 grammes de citrate de soude (ce dernier corps empêchant la précipitation du phosphate au moment de l'alcalinisation).

b) La meilleure réaction est égale au pH de 8,4.

c) L'aération doit être très large. Le milieu sus-indiqué, rendu solide par addition de gélose, donnant une culture très abondante et naturellement entièrement aérobie en 24 heures, alors qu'en milieu liquide, il faut attendre plusieurs jours pour obtenir la formation d'un voile donnant le même résultat, il est logique de préférer les cultures sur ce milieu solide aux cultures en bouillon.

2° L'émulsion de bacilles de Shiga cultivés sur ce milieu solide durant 48 heures, faite dans une quantité d'eau physiologique égale à la quantité

de milieu employée, additionnée de 0 cc. 5 de chloroforme par litre ou chauffée durant 1 heure à 60°, produit les plus grands effets toxiques. L'émulsion ci-dessus laissée 24 heures à 37°, puis filtrée sur bougie Chamberland F, donne un produit limpide légèrement verdâtre qui a une toxicité égale au liquide limpide obtenu en filtrant au bout de 15 jours une culture en bouillon.

3° Le produit le plus toxique ayant les meilleures propriétés antigènes, c'est l'émulsion bactérienne décrite ci-dessus qui doit immuniser le mieux. Ce fait est vérifié au moins en ce qui concerne l'immunisation des chevaux producteurs de sérum antidyentérique.

4° C'est l'action du formol, à la dose de 6 cc. par litre, durant 40 jours, à la température de 40°, qui atténue le mieux la toxicité du matériel immunisant tout en altérant le moins ses propriétés immunisantes.

5° La technique basée sur le phénomène de la floculation de Ramon paraît être le mode d'étalonnage des sérums anti-dysentériques le plus régulier et le plus simple.

Vu le Doyen, *Vu le Président.*

ROGER. F. BEZANÇON.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

LAPIE.

Protocoles d'Expériences

† = mort ; O = survie ; Oe = œdème ; H = hémorragie ;
D = diarrhée ; P = paralysie ; R = rétention d'urine

Numéro du lapin	POIDS	Doses reçues: I.V.	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	-------	-----------------------	-----------	-----------

PROTOCOLE I

1^o) Filtrat d'eau peptonée à 5 %

A 100	2020 gr.	0 cc. 2	D le 4 ^e jour	† le 5 ^e jour 1470 gr. Oe. H.
A 93	1835 gr.	0 cc. 05	O	O

2^o) Filtrat de bouillon peptoné à 2,5 %

A 95	1720 gr.	0.025	P et D le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 1375 gr. Oe
A 94	2130 gr.	0.05	D le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 1960 gr. Oe H.

3^o) Filtrat de bouillon peptoné à 1,25 %

A 96	2295 gr.	0 cc. 1	O	O
A 44	2320 gr.	1 cc.	P et D le 3 ^e jour	† le 6 ^e jour 2130 gr. Oe. R.

4^o) Filtrat de bouillon peptoné à 0,625 %

A 99	2295 gr.	0 cc. 5	maigrir de 230 gr	O
A 97	1885 gr.	2 cc.	P et D	† en 24 h. 1705 gr.

5^o) Filtrat de bouillon non peptoné

A 43	1390 gr.	1 cc.	O	† le 4 ^e jour 1790 gr. Oe. R.
A 98	2090 gr.	4 cc.	P le 2 ^e jour	† le 4 ^e jour 1790 gr. Oe. R.

Numéro du lapin	POIDS	Doses reçues: I.V	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	-------	----------------------	-----------	-----------

PROTOCOLE II

Filtrat de bouillon peptoné à 2 %

C 79	2275 gr.	0.033	P et D le 2 ^e jour	† le 3 ^e jour 2005 gr. Oe
C 86	2480 gr	0.02	D le 2 ^e jour	† le 6 ^e jour 1605 gr. H
C 83	1505 gr.	0.016	D le 3 ^e jour perte de 200 gr.	O

Filtrat de bouillon peptoné à 4 %

C 90	2460 gr.	0.033	perte de 225 gr.	O
C 80	2095 gr.	0.033	D le 2 ^e jour perte de 305 gr.	O
C 87	2415 gr.	0.02	P et D le lende- main	† le 2 ^e jour 2305 gr. Oe. R.

Filtrat de bouillon peptoné à 6 %

C 91	2540 gr.	0.05	P et D le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 185 gr. Oe
C 81	2045 gr.	0.033	P le 4 ^e jour	O
C 84	1465 gr.	0.016	perte de 135 gr.	O

PROTOCOLE III

1^o) Décoction de cheval

A 39	2610 gr.	0.02	P le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 2460 gr. Oe. R.
A 73	3125 gr.	0.015	P le 4 ^e jour	† le 6 ^e jour H

2^o) Macération de cheval

A 42	2345 gr.	0.02	P le 2 ^e jour	† le 4 ^e jour Oe, H et R
------	----------	------	--------------------------	--

Numéro du lapin	POI DS	Doses reçues: I.V.	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	--------	-----------------------	-----------	-----------

3^o) Décoction de bœuf

A 41	2520 gr.	0 02	P et D le 4 ^e jour	† le 5 ^e jour, vessie éclatée, remplie d'une énorme caillot, grosse ascite.
------	----------	------	-------------------------------	--

4^o) Macération de bœuf

A 66	1960 gr.	0 05	D le lendemain	† le 2 ^e jour Oe, H
A 40	2020 gr.	0 02	perte de 85 gr.	O

5^o) Décoction de veau

A 43	2150 gr.	0 02	P et D le 3 ^e jour	† le 5 ^e jour 1675 gr. Oe
A 74	2990 gr.	0.015	D le 3 ^e jour perte de 455 gr.	O

6^o) Macération de Veau

A 63	2020 gr.	0.05	maigrir de 150 gr.	O
A 46	2080 gr.	0.02	maigrir de 40 gr.	O

7^o) Décoction de dorade

A 65	1950 gr.	0 05	P et D le 3 ^e jour	† le 5 ^e jour 1810 gr. Oe, H et R
A 44	2130 gr.	0.01	maigrir de 60 gr.	O

8^o) Macération de dorade

A 67	1900 gr.	0.05	P et D le 3 ^e jour	† le 5 ^e jour 1550 gr. Oe, R
A 45	1875 gr.	0.02	maigrir de 145 gr.	O

Numéro du lapin	POIDS	Doses reçues : I.V.	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	-------	------------------------	-----------	-----------

PROTOCOLE IV

1^o) Décoction de cheval non concentrée

A 23	2090 gr.	0.05	maigrit	† le 12 ^e jour 1675 gr.
A 20	1820 gr.	0.02	O	O

2^o) Décoction de cheval concentrée

A 15	2320 gr.	0.05	D le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 2090 gr. R
A 17	2910 gr.	0.02	perte de 140 gr	O

3^o) Décoction de veau non concentrée

A 16	2460 gr.	0.02	P le 2 ^e jour	† le 3 ^e jour 2220 gr.
A 18	2160 gr.	0.01	perte de 250 gr.	O

4^o) Décoction de veau concentrée

A 19	2450 gr.	0.02	P le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 1900 gr. Oe
A 24	1950 gr.	0.01	perte de 100 gr.	O

PROTOCOLE V

1^o) Décoction de veau

A 99	2560 gr.	0.033	O	† le 2 ^e jour 2340 gr. Oe
A 85	1965 gr.	0.02	perte de 245 gr.	O
A 83	1700 gr.	0.015	D le 3 ^e jour	O
A 86	2280 gr.	0.01	perte de 175 gr. perte de 300 gr.	O

Numéro du lapin	POIDS	DOSES reçues: I. V.	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	-------	------------------------	-----------	-----------

2) Décoction + phosphate de K et citrate de Na

A 79	2140 gr.	0.02	D le 4 ^e jour P le 5 ^e jour	+ le 6 ^e jour 1570 gr. Oe
A 80	1860 gr.	0.015	P et D le 4 ^e jour	+ le 5 ^e jour 1330 gr. Oe
A 78	1920 gr.	0.01	perte de 90 gr.	O

3^e) Décoction + chlorure de Na

A 100	2210 gr.	0.033		+ le 2 ^e jour 2050 gr.
A 82	1720 gr.	0.02	perte de 210 gr.	O
A 81	1620 gr.	0.015	perte de 225 gr.	O

4^e) Décoction + tapioca

A 84	1430 gr.	0.1		+ le 4 ^e jour 1180 gr. Oe
A 96	1960 gr.	0.05	P le lendemain	+ le 2 ^e jour 1900 gr.
D 100	1970 gr.	0.033	P le 2 ^e jour	+ le 3 ^e jour 1565 gr.

PROTOCOLE VI

1^e) Gélose au bouillon Martin

C 3	1895 gr.	0.5		+ en 24 h. 1650 gr. Oe
C 8	2660 gr.	0.1	perte de 160 gr.	O

2^e) Gélose à la décoction de veau, 1 % de peptone

C 5	2110 gr.	0.2	P le 3 ^e jour	+ le 5 ^e jour 1510 gr. Oe
C 7	2595 gr.	0.1	P le 3 ^e jour	+ le 4 ^e jour 2295 gr.
C 19	2330 gr.	0.05	P le 4 ^e jour	O

Numéro du lapin	POIDS	Doses reçues: I.V.	SYMPTOMES	RÉSULTATS
--------------------	-------	-----------------------	-----------	-----------

3°) Gélose à la décoction de veau, 2,5 % de peptone
+ phosphate

C 2	2170 gr.	0.05	P le 3 ^e jour	† le 4 ^e jour 1740 gr. Oe
C 6	2755 gr.	0.1		† le lendemain 2455 gr. — Oe
C 20	2110 gr.	0.025	perte de 140 gr.	O

4°) Autolysat d'une culture de 48 heures sur la gélose ci-dessus

C 22	4285 gr.	0.05		† le 3 ^e jour 3880 gr. R, Oe
------	----------	------	--	--

5°) Autolysat d'une culture de 24 heures sur gélose
au pH de 7,5

C 100	1810 gr.	0.1	D perte de 200 gr.	O
C 99	2195 gr.	0.05	perte de 250 gr.	O
C 98	2220 gr.	0.025	perte de 100 gr.	O

PROTOCOLE VII

1) Sérum n° 15 mélangé à la toxine peptonée à 2 % et laissé en contact 30 minute à 37°.

Trois souris reçoivent 2 cc. s. c. du mélange de 0 cc. 4 du sérum et de 20 cc. de toxine (porportion flocculant la 1^{re}).

Les trois souris résistent.

Trois souris reçoivent 2 cc. s. c. du mélange de 0 cc. 2 de sérum et de 20 cc. de toxine (floculation secondaire).

Les trois souris résistent.

Trois souris reçoivent 2 cc. s. c. du mélange de 0 cc. 1 de sérum et de 20 cc. de toxine (pas de floculation).

Les trois souris meurent le 3^{me} jour.

La toxine pure tue les témoins aux doses de 1 cc., 0 cc. 5 et 0 cc. 25 injectées sous la peau.

PROTOCOLE VIII

Dosages de sérums antidisentériques par le procédé des mélanges (toxine sèche-sulfate de soude autolysée) effectués par injections intraveineuses sur les souris blanches de 15 à 20 grammes.

Numéros des sérums	Dose protégeant contre 6 doses mortelles				
15	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{250}$
100				$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{250}$
33	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{300}$		
34	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$		
38	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{50}$		
57	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{50}$		

Bibliographie des Auteurs cités

- ABT G. — La mesure de la réaction (p. H) par la méthode colorimétrique dans les milieux de culture et les milieux biologiques. — *Revue d'Hygiène*, 1923, T. 45, p. 1.
- ARCHARD et FOIX. — Sur l'emploi des corps gras comme véhicules des vaccins microbiens. — *C. R. Soc. Biol.*, 1916, T. 79, p. 209.
- ARLINDO DE ASSIS. — Da acção do formol sobre a Toxina dysenterica. Sobre a floculação do soro anti-dysenterico. — *Archivos do Instituto Vital Brazil*, Junho, 1925, T. III, fasc. 1.
- BALTEANO J. — La vaccination antidysentérique par la voie cutanée chez les lapins. — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, T. 88, p. 943.
- BERTHELOT A. et RAMON G. — Sur l'emploi du tapioca dans les milieux de culture. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 93, p. 896.
- BESREDKA. — De l'endotoxine soluble dysentérique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 304.
- Du mécanisme de l'infection dysentérique. De la vaccination contre la dysenterie par la voie buccale et de la nature de l'immunité antidysentérique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1919, p. 301.
- BOEHNCKE, HAMBURGER et SCHELENZ. — Untersuchungen über Ruhrimpfstoffe in vivo und vitro. — *Berlin Klin. Woch.*, 1918, § 134.

- BROKMAN H. — Recherches sur la sensibilité individuelle de l'homme à la toxine dysentérique. — C. R. Soc. Biol., 1923, T. 89, p. 1355.
- BROKMAN H. et PRYESMYCKI. — Sur la susceptibilité individuelle à la dysenterie. — C. R. Soc. Biol., 1925, T. 92, p. 989.
- BROUGHTON-ALCOCK. — Antidysenterie vaccination. — *British Med. Journ.*, 1914, p. 306.
- BUJWID. — W sprawie przygotowania surowicy przeciwczernkowej. — *Przegląd Epidemiologiczny*, 1920-1921, T. 1, p. 348.
- CASTELLANI. — Notes on dysentery vaccination. — *British Med. Journ.*, 1916, p. 306.
- CHIBA. — Die verwendung der trockenen hitze bei herstellung von vakzinen (dysenteriebakterien). — *Centralbl. f. Bakteriol*, 1922, Bd 88, orig., S. 79.
- COMBIÈSCO D., ALICE MAGHERU et G. CALALB. — Vaccination préventive contre la dysenterie par la voie digestive chez le lapin. — C. R. Soc. Biol., 1923, T. 88, p. 904.
- CONRADI H. — Ueber Gösliche, durch aseptische autolyse erhaltene giftstoffe von Zuhr. — *Deutsche Medicin Woch.*, 1903, Bd. 29, § 26.
- COPPINGER et ROBERTSON. — Preliminary experiments with a view to the preparation of a non-toxic dysentery vaccine. — *Journal of the Royal Army Med. Corps.*, 1922, V. 38, p. 243.
- COYNE P. et AUCHÉ B. — Sérum antidysentérique polyvalent. — C. R. Soc. Biol., 1906, T. 61, p. 131.
- Les sérums antidysenteriques polyvalents. — C. R. Soc. Biol., 1908, T. 65, p. 629.
- CERNEL. — Beitrag zur Schutzimpfung gegen Dysenterie mittels serovakzine. — *Zeitschr. F. Hyg.*, 1920, Bd 91, § 53.

- DEAN H. R. et ADAMSON R. S. — Method for the preparation of a non-toxic dysentery vaccine. — *British Med. Journ.*, 1916, p. 611.
- DITTHORN F. et SOEWENTHAL W. — Ein neuer multivalenter Ruhrschutzzimpfstoff. — *Deutsche. Medicin. Woch.*, 1917, § 966.
- DOERR R. — Das dysenterietoxin. — *Wiener Klinisch. Woch.*, 1906, § 1218.
- DOERR R. — Das dysenterietoxin. — *Iena G. Fischer*, 1907.
- Rapport sur la standardisation du sérum antidysentérique. — Société des Nations, Comité d'Hygiène, 1922, CH/SS/1.
- DOPTER CH. — Effets expérimentaux de la toxine dysentérique sur le système nerveux. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1905, p. 353.
- Vaccination antidysentérique expérimentale. — *C. R. Soc. Biol.*, 1907, T. 63, p. 379.
- Vaccination antidysentérique expérimentale par les voies digestives. — *C. R. Soc. Biol.*, 1908, T. 64, p. 868.
- Action antiendotoxique du sérum antidysentérique préparé par inoculation intraveineuse de cultures vivantes seules. — *C. R. Soc. Biol.*, 1908, T. 65, p. 28.
- DOPTER CH., DUMAS J. et COMBIESCO D. — Sur la nature de la toxine dysentérique. — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, T. 87, p. 1140.
- Rapport sur les recherches sur les méthodes de titrage du sérum antidysentérique. — Société des Nations, Comité d'Hygiène, 1922, CH/SS/25.
- DUMAS J., RAMON G. et SAÏD BILAL. — Les propriétés immunisantes de l'anatoxine dysentérique. — *C. R. Académie des Sciences*, 1925, 27 juillet.

- ELLINGER et ADLER. — Die wirkung von Ruhrgift auf den kreislauf. — *Archiv. f. Experimentelle Pathologie und Pharmacol.*, 1919, Bd. 85, S. 95.
- FLEXNER et AMOSS. — The rapid production of antidy-senteric serum. — *Journ. of Experim. Medic.*, 1915, V. 21, p. 515.
- FROUIN A. et MOUSSALI A. — Action des sels de terres rares sur les bacilles dyentériques. — *C. R. Soc. Biol.*, 1919, T. 82, p. 973.
- FUKCHARA. — A new method of festing antitoxic dysen-tery serum. — *Journal of Immunology*, 1919, V. 4, p. 299.
- GABRITSCHESWSKI. — Ueber die technik der immunisie-rung von pferden gegen Dysenteric. — *Centralbl. f. Bakteriöl*, 1903, Bd. 34, Rep. S. 504.
- GLOTOV E. — De l'anatoxine dysentérique. — *Journal de microbiologie, de pathologie générale et des maladies infectieuses*, Moscou, 1925, Vol. II, 1.
- GRAEME GIBSON. — A new method of preparation of a vaccine against bacillary dysentery which abo-lishes severe local reaction. Also experiments with this vaccine on animals and man. — *Journal of the Royal Army Medical Corps*, 1917, V. 28, p. 616.
- HELLER. — Ist bei der Dysenterievergiftung wesentlich ein echtes toxin oder ein endotoxin beteiligt ? — *Centralbl. f. Bakteriöl.*, 1908, Bd 42, ref. S. 30.
- HIRSZFELD L. — Premier rapport sur la standardisation des sérums antidysentériques. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1922, CH/SS/16.
- HIRSZFELD L. UND PRZESMYCKI F. — Weitere untersu-chungen ueber die standarisierung der dysen-teriesera. — *Société des Nations*, 1924, CH/SS/37.

- JOHNSON J. et MILNE A. J. — Combined preventive inoculation against typhoid and paratyphoid fever and bacillary dysentery. — *British Medic. Journal*, 1916, p. 88.
- JONESCO-MIHAESTI et POPESCO C. — L'influence de la concentration en ions H sur le développement et la production de toxines par le bacille de Shiga. — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, T. 86, p. 893.
- JONESCO-MIHAESTI et COMBIESCO. — Premier rapport présenté par l'Institut Sérologique de Bucarest (Professeur Cantacuzène) sur la titration de la toxine et du sérum antidysentériques. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1924, CH/SS/45.
- JÖTTEN. — Die verwendung neutralisierter antiformin. Bakterienauflösungen zur Gewinnung hochwertiger Agglutinierender Ruhrimmunsera. — *Zeitschr f. Immunit*, 1920, Bd 29, p. 267.
- KANAÏ. — Dysentery immunisation in rabbits by the oral and subcutaneous methods. — *The Sister Institute of Preventive Medicine*, Collected Papers, 1921-1922, n° 18.
- KARASAWA. — Zur wirkung des Dysenterietoxins auf das Zentralnervensystem. — *Zeitschr. F. Immunit*, 1910, Bd 6, S. 390.
- KLEIN B. — Notiz über den Dysenterubazillus und das Dysenterietoxin. — *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1906, Bd. 41, S. 201.
- Ueber die löslichen giftstoff eder Ruhrbazillen. — *Centralbl. Bakteriol.*, 1907, Bd. 44, S. 144.
- KOLLE W., HELLER O. et DE MESTRAL V. — Untersuchungen über Dysenterietoxine das Dysenterieserum und seine wertbestimmung. — *Arbeiten aus dem Institut zur erforschung der Infektions krankheiten*, in Bern, 1908, Heft 1, S. 1.

- KOLLE W. — Ueber die beziehungen der sogenannten endotoxine zu den toxinen. — *Centralbl. f. Bakteriол.*, 1909, Bd. 42, add., S 27.
- KOLLE W., SCHLOSSBERGER H. et PRIGGE R. — Ueber eigenschaften, wirkungsart und wertbestimmung des Dysenterieserums. — *Société des Nations, Comité d'Hygiène*, 1924, CH. 213.
- KRAUS R. et DOERR R. — Ueber Dysenterieantitoxin. — *Wien. Klin. Woch.*, 1905, Bd. 18, S. 158.
- Die experimentelle grundlage einer antitoxischen therapie der Bazillären Dysenterie. — *Zeitschr. f. Hygiene*, 1906, Bd. 55, S. 1.
- KRAUS R., AWOKI T. et KOVACS N. — Ueber aktive immunisierung mit atoxischen kulturfiltraten II Mitteilung : Dysenteriebazillus Shiga-Kruse. — *Zeitschr. f. Immunit.*, 1925, Bd. 45, n° 1.
- KRUSE. — Weitere untersuchungen über die Ruhr und dii Ruhrbazillen. — *Deutsche Medicin Woch.*, 1901, Bd. 1, S. 386.
- LESBRE PH. — Immunisations expérimentales par anatoxines contre le bacille de Shiga. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 93, p. 612.
- LESBRE PH. et VERDEAU A. — Quelques particularités de l'anatoxine dysentérique. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 92, p. 165.
- LÜDKE H. — Untersuchungen über die bacilläre Dysenterie. — *Centralbl. f. Bakteriол.*, 1905, Bd. 38, S. 289, 298.
- Ueber die Gewinnung von Dysenterietoxin. — *Berlin. Klin. Woch.*, 1906, S. 3, 54.
- MC CARTNEY et OLITSKY. — Séparation of the toxins of bacillus Dysenteriac Shiga. — *Journ. of. Experim. Medic.*, 1923, V. 37, p. 767.
- MAC CONKEY. — Notes on the standardization of Antidysentery serum. — *Société des Nations, Comité d'Hygiène*, 1924, CH/SS/38.

- NEISSER M. et SHIGA K. — Ueber freie receptoren von typhus und Dysenteriebazillen und über das Dysenterietoxin. — *Deutsche Medic. Woch.*, 1903, Bd 29, S. 61.
- NEUFELD. — Sur le titrage du sérum antidysentérique. — *Société des Nations*, Comité d'hygiène, 1924, CH/SS/34.
- NICOLLE C. et CONSEIL E. — Vaccinations préventives par voies digestives chez l'homme dans la dysenterie bacillaire. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1922, p. 579.
- NICOLLE M., DEBAINS E. et LOISEAU G. — Etudes sur le bacille de Shiga. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1916, p. 364.
- O'BRIEN, SUDMERSEN, EAGLETON et MAC CONKEY. — Report on the standardisation of anti-dysentery serum. — *Société des nations*, Comité d'Hygiène, 1922, CH/SS/13.
- O'BRIEN, SUDMERSEN et RUNGE. — Report II : Dysentery toxin et Antitoxin and Unitage of sera. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, CH/SS/36.
- OLITSKY P. K. — An experimental study of vaccination against bacilli dysenteriac. — *Journ. of Exper. Medic.*, 1918, Vol. 28, p. 69.
- OLITSKY P. K. et KLIGLER J. J. — Toxins and antitoxins of bacillus dysenteriac Shiga. — *Journ. of Experim. Medic.*, 1920, Vol. 31, p. 19.
- PANE et LOTTI. — Ueber Angriffstoffe. — *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1907, Bd. 43 Orig., S. 718.
- MARRIAN PERRY H. et COPPINGER C. J. — Observations on the employment of anaerobically-grown *Bacillus Dysenteriae* Shiga as a vaccine. — *Journal of the Royal Army Medic. Corps*, 1925, vol. 45, p. 241.

- PETRUSCHKY. — Erfahrungen über percutane Schutzbehandlung bei Ruhr. — *Medizin Klinik*, 1919, Bd 15, S. 864.
- PFEIFFER R. — Ueber die beziehungen der sogenannten endotoxine zu den toxinen. — *Centralbl. f. Bakteriol*, 1908, Bd 42, ref. S. 1.
- PFEIFFER R. et UNGERMANN E. — Zur antitoxinfrage bei der Dysenterie. — *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1909, Bd 50, orig. S. 534.
- RAMON G. — La floculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtériques. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1923, p. 1001.
- Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtérique, pouvoir floculant et propriétés immunisantes. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1924, p. 1.
- RANQUE et SENEZ. — Essais de vaccination préventive par injection à l'homme de vaccin antidysentérique iodé. — *Société de Pathologie comparée*, 1918, séance du 12 oct.
- ROSENTHAL L. — Ueber das Dysenterietoxin. — *Centralbl. f. Bakteriol*, 1903, Bd. 33, Ref., S. 463.
- Das Dysenterietoxin (auf natürlichem wege gewonnen. — *Deutsche Medicin. Woch.*, 1904, Bd. 30, S. 235.
- ROSENTHAL L. — Gesellschaft für Naturkunde Anthropologie und Ethnologie in Moskau. — *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1905, Bd. 36, S. 23.
- RUFFER M. A. et WILMORE J. G. — The production of immunity against dysentery toxin. — *British Medic. Journ.*, 1908, V. 2, p. 1176.
- SACHS H. et GEORGI W. — Zur wertbestimmung des antitoxischen Dysenterieserums. — *Medizin Klinik*, 1918, Bd. 14, S. 610.
- SCHLOSSBERGER H. et HARTOCH O. — Weitere untersuchungen über die wertbestimmung des anti-

- toxischen dysenterieserums. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1924, CH/SS/47.
- SELTHER H. — Ueber die Dysenteriegifte. — *Zeitschr. j. Immunit.*, 1910, Bd. 5, Orig., S. 458.
- SHIGA K. — Ueber den Dysenteriebacillus. — *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1898, Bd. 24, S. 913.
- Ueber versuche zur Schutzimpfung gegen die Ruhr. — *Deutsche Med. Woch.*, 1903, Bd. 1, S. 327.
- Rapport sur le sérum antidysentérique. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1922, CH/SS/8.
- SHIGA K., KAWAMURA H. et TSUCHIYA K. — The standardisation of Dysentery Serum. First report. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1924, CH. 193.
- The standardisation of Dysentery Serum. Second report. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1924, CH. 193.
- SKSCHIVAN T. et STEFANSKY W. — Zur frage der Serotherapie bei Dysenterie. — *Berlin Klin. Woch.*, 1907, S. 157.
- SORDELLI. — Emploi de petits oiseaux pour mesurer l'activité de la Toxine dysentérique et titrer le sérum anti-dysentérique. — *C. R. Soc. Biol.*, 1920, T. 83, p. 1245.
- TARASSEVITCH L., KOUNINA E. et MAXAROWA J. — Titrage de la Toxine dysentérique. — *Société des Nations*, Comité d'Hygiène, 1924, CH. SS. 39.
- THOTTA et FALSEN SUNDT. — Toxins of Bact. dysenteriac. — *Journ. of Bactériol.*, 1921, Vol. 6, p. 501.
- THOMSON. — Attempts to produce a safe and effective Bacillus Dysenteriac Shiga vaccine for prophylactic purposes. — *British Med. Journ.*, 1916, p. 303.

- Detoxicated Vaccines. — *The Lancet*, 1919, v. 196, p. 1102.
- THOMSON. — Biochemistry of germs and other proteins. — *The Lancet*, 1921, v. 150, p. 795.
- VAILLARD L. et DOPTER CH. — La dysenterie épidémique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1903, p. 463.
- Le sérum antidysentérique. — *Annales de l'Institut Pasteur*, 1906, p. 321.
- VINCENT H. — La vaccination contre la dysenterie bacillaire par l'ethero-vaccin. — *Revue d'Hygiène*, 1920, T. 42, p. 657.
- VIOLLE H. — Vaccins de microbes tués par le chlorure d'or. — *C. R. Soc. Biol.*, 1925, T. 93, p. 115.
- WHITMORE, FENNEL et PETERSEN. — An experimental investigation of lipovaccines. — *Journ. of Amer. Med. Ass.*, 1918, v. 70, p. 427.
- YOSHIOKA. — Ueber das bakteriengift, insbesondere die löslichen gifte des dysenterie. — *Zeitschs f. Immunit.*, 1923, Bd. 36, S 395.
- ZANGGER R. — Zur wertbestimmung der antidysenteriesera. — *Zeitschr. f. Hyg.*, 1923, Bd. 101, S. 39.
- ZDANSKY R. et HERZOG B. M. — Zur wertbemessung der antitoxischen Dysenteriesera. — *Zeitschs. f. Hyg.*, 1924, Bd. 102, S. 352.
- ZEITLIN. — Gesellschaft für Naturkunde. — *Centralbl. f. Bakteriol*, 1905, Bd. 36, S. 23.
-

Table des Matières

	Pages
Introduction	13
CHAPITRE I.	
Toxicité du bacille dysentérique Shiga.....	15
CHAPITRE II.	
Toxicité des milieux de cultures liquides privés de leurs germes.....	19
A) Du rôle de la concentraton en ions H libres dans le milieu	19
B) De l'influence du temps de culture.....	23
C) De l'influence de la température.....	26
D) De l'influence de l'aération.....	27
E) De l'influence de la composition du milieu et en par- ticulier de la qualité de peptone.....	28
F) Du rôle des souches de bacilles de Shiga.....	33
G) De l'influence de la proportion de peptone Chapoteaut	34
H) Du rôle de la composition du bouillon.....	39
CHAPITRE III.	
De la toxicité des cultures tuées.....	46
CHAPITRE IV.	
De la toxicité des produits d'autolyse et de lavage des cultures sur milieu solide.....	49
CHAPITRE V.	
De l'identité des produits toxiques du bacille de Shiga.	56
CHAPITRE VI.	
Vaccination	70
A) Vaccins à toxicité non modifiée.....	70
a) De la vaccination à l'aide de bacilles tués par la chaleur	70

b) De la vaccination à l'aide de bacilles tués par un moyen chimique.....	80
e) De la vaccination par les produits toxiques séparés des corps bactériens.....	81
B) Des vaccins à toxicité réduite.....	81
a) Des vaccins atténués au moyen de sérum spécifique.	81
b) Des vaccins rendus atoxiques par des procédés chimiques ou physiques.....	88
 CHAPITRE VII.	
De l'immunisation des animaux en vue de l'obtention d'un sérum antidysentérique.....	102
 CHAPITRE VIII.	
De l'étalonnage du sérum antidysentérique.....	113
De la Flocculation.....	128
Conclusions générales.....	142
Protocoles d'expériences.....	145
Bibliographie.....	153

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

